



การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่แยก
ได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้

Screening and optimization of lipase production by the isolated bacterium from
wastewater of fish canning process and application

พัคตร์พิมล อึ้งเจริญวิวัฒน์

Pakpimol Ungcharoenwiwat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ
แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำเสียของโรงงานผลิตปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้
ผู้เขียน นางสาวพัชร์พิมล อึ้งเจริญวิวัฒน์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์กิตติกุล)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทรี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงษ์กิตติกุล)

.....กรรมการ
(ดร.สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่แยกจากของเสียโรงงานปลากระป๋องและการประยุกต์ใช้
ผู้เขียน	นางสาวพัชร์พิมล อึ้งเจริญวิวัฒน์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

การแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินรอบๆ บ่อคักไข่มันและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตปลากระป๋อง โดยใช้อาหารพื้นฐาน (basal medium agar) ที่ประกอบด้วยน้ำมันปลาที่สกัดจากน้ำนิ่งปลาทูน่า 1 เปอร์เซ็นต์ และ rhodamine B 0.001 เปอร์เซ็นต์ พบแบคทีเรียเจริญ 111 ไอโซเลท และ 80 ไอโซเลท สามารถเรืองแสงยูวี เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานที่มีไตรบิวไทรีน 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามี 42 ไอโซเลทที่เกิดวงใสรอบโคโลนี โดยเชื้อ GT3 (19) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงที่สุด เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาที่สกัดจากน้ำนิ่งปลาทูน่า 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีแบคทีเรีย 11 ไอโซเลท ที่มีค่ากิจกรรมในการย่อยสลายสูง โดยไอโซเลท EQ3 มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายสูงที่สุด คือ 1.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วย 16 S rDNA พบว่ามีความเหมือนกับ *Burkholderia* sp. 99 เปอร์เซ็นต์ (bp/bp) จึงให้ชื่อว่า *Burkholderia* sp. EQ3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia* sp. EQ3 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาที่สกัดจากน้ำนิ่งปลาทูน่า 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และทริปโตซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 1.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

การแยกเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผลิตโดย *Burkholderia* sp. EQ3 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เอทิลแอลกอฮอล์ และอะซิโตน พบว่าอะซิโตนสามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้กิจกรรมทั้งหมดสูงที่สุด 84.8 ยูนิต กิจกรรมจำเพาะ 4.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์ 9.4 เท่า ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ พบว่าเอนไซม์มีสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยาการย่อยสลายที่พีเอช 6.0 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวที่พีเอชเป็นค่า คือ 9.0-12.0 หลังจากรบเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เมื่อนำเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 ไปประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้ไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อคักไข่มัน โดยใช้เฮกเซน ซึ่ง

ประกอบด้วยกรดไขมัน คือ กรดไมริสติก 4.0 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มติก 47 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก 10 เปอร์เซ็นต์ กรดโอลิก 24 เปอร์เซ็นต์ และกรดลิโนลินิก 9.5 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการใช้ เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปทางการค้า 5 ชนิด คือ Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Novozyme 435, Lipase PS และ Lipase AK เร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันที่มีสารตั้งต้น คือ ไขมันที่สกัดจากก้อน ไขมันในบ่อดักไขมัน 115.3 มิลลิกรัม (น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย= 839.12 กรัม/โมล) ละลายในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ซีทิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิกรัม และเอนไซม์ตรึงรูป 1 ยูนิต บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส เวลาที่ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM และ Novozyme 435 สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 92.25, 19.72 และ 90.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้ Novozyme 435 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ คือ ปริมาณเอนไซม์ 1 ยูนิต อัตราส่วนโมลของ ไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันกับซีทิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:2 มีเฮกเซนเป็นตัวทำ ละลายอินทรีย์ และทำปฏิกิริยาโดยใช้ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 90.59 เปอร์เซ็นต์ ที่ 3 ชั่วโมง ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหายาจาก *Burkholderia* sp. EQ3 ที่ผ่านการตกตะกอน ด้วยอะซิโตน พบว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์ 40 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่าง ไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันกับซีทิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:2 ละลายในไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร เวลาที่ 200 รอบต่อนาที สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุด 95.07 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 6 ชั่วโมง

Thesis Title Screening and Optimization of Lipase Production by Bacteria Isolated from Wastes of Canned Fish Factory and Application

Author Miss Pakpimol Ungcharoenwiwat

Major Program Biotechnology

Academic Year 2009

ABSTRACT

The isolation of lipase producing bacteria from soil samples around grease trap pond and wastewater samples from wastewater treatment system of canned fish factory was done on basal medium (agar) containing 1% extracted fish oil (from tuna pre-cooking condensate) and 0.001% rhodamine B. One hundred and eleven bacterial isolates were grown in this medium but only 80 isolates showed fluorescent under UV light. These 80 bacterial isolates were screened for lipase activity on basal medium (agar) containing 1% tributyrin. 42 isolates showed clear zone around colony while the isolates GT3 (19) showed highest index of tributyrin hydrolysis. Only 11 isolates showed high activities and the isolate EQ3 had the highest hydrolysis activity (1.5 U/ml) in basal medium (broth) containing 1% of extracted fish oil. The identification of the isolate EQ3 by 16S rDNA showed 99% identity (bp/bp) with *Burkholderia* sp. and was designated as *Burkholderia* sp. EQ3. The optimum conditions for lipase production by *Burkholderia* sp. EQ3 were 1% extracted fish oil as a carbon source, 0.1% tryptone as a nitrogen source, at 37 °C with 200 rpm for 12 h with 1.77 U/ml of lipase activity.

The crude lipase was separated from the culture broth of *Burkholderia* sp. EQ3 by precipitate with ammonium sulfate, ethyl alcohol and acetone. Acetone precipitation provided highest total lipase activity (84.8 U, 4.7 U/mg of specificity and 9.4 purification folds). The crude lipase showed maximum activity at pH 6.0 and 25°C and was stable at pH range 9.0-12.0 after 1 h of incubation.

The crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 was used in wax esters synthesis with the fat from fat cake in grease trap extracted with hexane. This fat was composed of myristic acid (4.0%), palmitic acid (47%), stearic acid (10%), oleic acid (24%) and linoleic acid (9.5%) in

comparison with the 5 commercial immobilized lipases (Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Novozyme 435, Lipase PS and Lipase AK). The reaction was carried out by mixing 115.3 mg of fish fat (average MW= 839.12 g/mol) in 1 ml of hexane, 100 mg cetyl alcohol and immobilized lipases 1 U at 45°C and 300 rpm for 24 h. The Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM and Novozyme 435 could synthesize wax esters 92.25, 19.72 and 90.93%, respectively. The synthesis of wax esters from fish fat by Novozyme 435 was optimized. The optimum conditions were enzyme 1 U, molar ratio of fat from extracted fat cake in grease trap to cetyl alcohol 1:2 in hexane at 37°C and 200 rpm. The yield of wax esters at optimum conditions was 90.59% at 3 h. On the other hand the optimum conditions for wax esters synthesis by crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 were crude lipase 40 U, molar ratio of fat from extracted fat cake to cetyl alcohol 1:2 in isooctane at 30°C and 200 rpm and the yield of wax esters was 95.07% at 6 h.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษาและชี้แนะแนวทางการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงษ์ทริศรี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนทัศนศึกษานักอุตสาหกรรมเกษตร และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัย

ขอขอบคุณโรงงานสงขลาแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดิน น้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน และตัวอย่างก้อนไขมันบริเวณบ่อดักไขมัน ที่ทำให้งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้โอกาสข้อคิดดีๆ กำลังใจและด้านการเงินในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ สมาชิกห้องแล็บเอนไซม์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือ กำลังใจและความอบอุ่นในการทำวิจัยในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนทุก ๆ ท่านที่ไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

พัชร์พิมล อึ้งเจริญวิวัฒน์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(8)
รายการตาราง.....	(10)
รายการภาพ.....	(11)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
บทนำตั้งเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	3
วัตถุประสงค์.....	32
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	33
วัสดุ.....	33
อุปกรณ์.....	34
วิธีการวิเคราะห์.....	34
วิธีการวิจัย.....	38
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	49
1. การเก็บตัวอย่าง.....	49
2. การศึกษาองค์ประกอบของน้ำเสียทางเคมี การสกัดไขมันจากก้อนไขมัน ในบ่อดักไขมันและศึกษาองค์ประกอบของไขมัน.....	50
3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	55
4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	59
5. การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย.....	60
6. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	61
7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	62
8. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสด้วยการตกตะกอน.....	70
9. การศึกษาคูณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส.....	71
10. การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส.....	75
4. บทสรุป.....	90

สารบัญ

	หน้า
เอกสารอ้างอิง.....	92
ภาคผนวก.....	108
ประวัติผู้เขียน.....	127

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Characteristics of wastewater in tuna canning plant.....	6
2. Characteristics of wastewater at different steps of canned tuna processing.....	6
3. Chemical characteristics of wastewater from tuna canning plant.....	50
4. GC-MS analysis of fatty acid in partially purified extracted fat from fat cake.....	55
5. Precipitation of crude lipase from <i>Burkholderia</i> sp. EQ3.....	71
6. Comparisons of wax esters production by Novozyme 435 and crude lipase from <i>Burkholderia</i> sp. EQ3.....	91
7. Temperature and pH value of samples.....	113

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Flow chart of tuna canning process and waste from process.....	5
2. The pathway of lipid degrading by β -oxidation.....	10
3. Chemical structure of paraffin wax.....	27
4. Wax esters synthesis by esterification of lipase.....	30
5. Wax esters production by chemical and enzymatic methods.....	30
6. Composition of fatty acid from purified fish oil (A), extracted fat from fat cake (B) and mixture of purified fish oil and extracted fat from fat cake (C) by TLC/FID analyzer.....	53
7. Composition of fatty acid from partial purified extracted fat 4 fractions; fraction 1(A), fraction 2(B), fraction 3(C) and fraction 4(D).....	57
8. Tributyrin hydrolysis by bacterial isolates grown on basal medium containing 1% tributyrin at 37°C for 48 h.....	58
9. Hydrolysis index of the 43 bacterial isolates grown in basal medium containing 1% tributyrin at 37°C for 48 h.....	58
10. Lipase activity of 11 bacterial isolates. (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0, 37°C and 300 rpm for 30 min).....	59
11. Phylogenetic tree of <i>Burkholderia</i> sp. EQ3.....	60
12. Growth and lipase production of <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 cultivated in basal medium containing 1% extracted fish oil from pre-cooking condensate at 37°C with shaking speed of 200 rpm.....	62
13. Effect of various carbon sources 1% (w/v) on pH (A), growth and lipase activity (B) of <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 grown in basal medium containing 1% carbon source (palm oil, extracted fish oil from pre-cooking condensate, tributyrin, glucose, sucrose and molasses) at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h...	64

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure	Page
14. Effect of extracted fish oil from pre-cooking condensate concentration on pH (A), growth and lipase activity (B) of <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 grown in basal medium at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h.....	65
15. Effect of nitrogen sources on pH (A), growth and lipase activity (B) of <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 grown in basal medium containing 1% extracted fish oil from pre-cooking condensate at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h....	68
16. Effect of tryptone concentration on pH (A), growth and lipase activity (B) of <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 grown in basal medium containing 1% extracted fish oil from pre-cooking condensate at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h.....	69
17. Effect of temperature on the activity of crude lipase produced by <i>Burkholderia</i> sp. EQ3. (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0 and 300 rpm for 30 min).....	72
18. Effect of pH on the activity of crude lipase produced by <i>Burkholderia</i> sp. EQ3. (reaction condition: palm oil as substrate at 25°C and 300 rpm for 30 min).....	72
19. Effect of temperature on the stability of crude lipase produced by <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 for 1 h at pH 6.0 (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0, 25°C and 300 rpm for 30 min).....	74
20. Effect of pH on the stability of crude lipase produced by <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 at 25°C for 1 h. (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0, 25°C and 300 rpm for 30 min).....	74
21. Screening of wax esters production by 5 commercial immobilized lipases. (reaction mixture: crude fat 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:3 mol/mol), hexane 1 ml, enzyme 1 U at 45°C and 300 rpm for 24 h).....	77

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure	Page
22. Time courses of wax esters synthesis from crude fat by Lipozyme RM IM and Novozyme 435 (A) (reaction mixture : fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:3 mol/mol), hexane 1 ml, enzyme 1 U at 45°C and 300 rpm for 24 h) and crude lipase from <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 (B) (reaction mixture: fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:2 mol/mol), hexane 1 ml, at 37°C and 200 rpm for 24 h).....	80
23. Effect of Novozyme 435 concentrations on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake. (reaction condition: fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:3 mol/mol), at 37 °C and 200 rpm for 6 h).....	81
24. Effect of temperature on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake by Novozyme 435 (A) (reaction condition: enzyme 1 U, substrate molar ratio 1:3 and 300 rpm for 6 h) and crude lipase from <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 (B) (reaction condition: enzyme 40 U, substrate molar ratio 1:2 and 200 rpm for 12 h).....	83
25. Effect of molar ratio of fat extracted from fat cake and cetyl alcohol on wax esters synthesis by Novozyme 435 (A) (reaction condition: enzyme 1 U at 37°C and 200 rpm for 3 h) and crude lipase from <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 (B) (reaction condition: enzyme 40 U, at 30°C and 200 rpm for 9 h).....	85
26. Effect of organic solvents on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake by Novozyme 435 (A) (reaction condition: enzyme 1 U, substrate molar ratio 1:2, at 37 °C and 200 rpm for 3 h) and crude lipase from <i>Burkholderia</i> sp. EQ3 (B) (reaction condition: enzyme 40 U, substrate molar ratio 1:2, at 30°C and 200 rpm ...	88
27. Effect of initial water activity (a_w) on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake by Novozyme 435. (Reaction condition: enzyme 1 U, substrate molar ratio 1:2, 37°C and 200 rpm for 3 h).....	89
27. Standard curve of palmitic acid ($\mu\text{g/ml}$).....	111
28. Standard curve of bovine serum albumin (mg/ml).....	111

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ภาคใต้ของประเทศไทยมีภูมิประเทศติดทะเลจึงมีอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเลบรรจุกระป๋องส่งออกในแถบนี้เป็นจำนวนมากโดยเฉพาะอาหารทะเลประเภทปลา ซึ่งกระบวนการผลิตจะมีการใช้ความร้อนในรูปของไอน้ำอยู่หลายขั้นตอนและเกิดเป็นของเสียเหลือทิ้งทั้งของแข็งและของเหลวเป็นจำนวนมาก ซึ่งของเสียที่เป็นของเหลวจะถูกนำไปรวมกันที่บ่อบำบัดน้ำเสียเพื่อทำการบำบัดก่อนที่จะมีการปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ไขมันชั้นบางๆ ที่ลอยอยู่บนผิวน้ำทำให้เกิดการสะสมของชั้นไขมันหนาขึ้น ซึ่งทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมและภาระการบำบัดน้ำทิ้งของหน่วยงานเป็นอย่างมาก หากมีการนำวัสดุเศษเหลือส่วนนี้มาใช้ก็จะเป็นการเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรและลดภาระการบำบัดน้ำทิ้งให้แก่โรงงาน เช่น การนำไขมันไปทำสบู่ ไบโอดีเซล เทียนไข และการทำแว็กซ์ เป็นต้น

แว็กซ์หรือแว็กซ์เอสเทอร์เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันสายยาวกับแอลกอฮอล์ของกรดไขมันสายยาว แว็กซ์เอสเทอร์สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นส่วนผสมสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ของอุตสาหกรรมต่างๆ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางใช้แว็กซ์เอสเทอร์เป็นสารหล่อลื่นให้ความชุ่มชื้น (Peter and Robert, 2001) ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ใช้เป็นสารทำให้เกิดฟองเพื่อช่วยในการปลดปล่อยสารในยาเม็ด (Savolainen *et al.*, 2003) และแว็กซ์ยังสามารถใช้เป็นสารหล่อลื่น ในงานปั้นขึ้นรูป และสารให้ความเงาวาว (Chen and Wang, 1997) แว็กซ์เอสเทอร์ตามธรรมชาติพบในพืชและสัตว์ แต่ปริมาณน้อย การผลิตแว็กซ์เอสเทอร์สามารถทำได้โดยใช้กระบวนการทางเคมีแต่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปฏิกริยารุนแรง อาจได้สารตัวกลางที่เป็นพิษและกำจัดยาก ดังนั้นปฏิกริยาโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติการ

เอนไซม์ไลเปส (lipase หรือ Triglycerol acylhydrolase; EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ของ tri-, di- หรือ monoglycerides ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งรวมทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย (Rapp and Backhaus, 1992; Jaeger *et al.*, 1994) กลไกการทำงานของเอนไซม์นี้แตกต่างจากเอนไซม์ที่

ละลายน้ำทั่วไป คือ จะเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมัน ทั้งนี้เนื่องจากสัณฐานของเอนไซม์นี้เป็นน้ำมันซึ่งไม่ชอบน้ำแต่เอนไซม์อยู่ในสถานะที่มีน้ำ (Jaeger *et al.*, 1994)

แม้ว่าเอนไซม์ไลเปสจะมีสมบัติทั่วไปในการเร่งปฏิกิริยาพื้นฐานเดียวกันดังกล่าวข้างต้น แต่ผลจากการศึกษาไลเปสซึ่งแยกจากแหล่งต่างๆ กันในธรรมชาติ พบว่าเอนไซม์จากแต่ละแหล่งจะมีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยา อาทิเช่น มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ตัดพันธะเอสเทอร์ชนิดของกรดไขมัน รูปแบบการจัดเรียงตัวใน โมเลกุลของสัณฐาน สภาพกรด-ด่าง หรืออุณหภูมิที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา เป็นต้น (Yamane, 1987; Sonnet, 1988; Malcata *et al.*, 1992) เนื่องจากไลเปสที่แยกจากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอย่างเช่นพืชและสัตว์มาใช้ประโยชน์มีจำกัดอยู่มาก ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบหลายด้าน คือ มีความคงตัวสูงกว่า สามารถผลิตเอนไซม์ปริมาณมากกว่าเพราะเชื้อจุลินทรีย์เจริญได้อย่างรวดเร็ว ควบคุมง่ายและผลิตเอนไซม์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ และปัจจุบันได้มีการค้นหาเอนไซม์ไลเปสใหม่ๆ เพื่อให้เหมาะกับการใช้งานในด้านต่างๆ เรื่อยมา

ศักยภาพของเอนไซม์ไลเปสในทางอุตสาหกรรมมีมาก เช่น ใช้ในอุตสาหกรรม การผลิตผงซักฟอก อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมน้ำมัน การปรับแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหารและการสังเคราะห์เคมีภัณฑ์ชนิดใหม่ เป็นต้น (Schmid, 1987; Yamane, 1987; Bjorkling *et al.*, 1991; Bornscheuer, 1995) และในการผลิตทางอุตสาหกรรมเหล่านี้ต้องการเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะสามารถทำงานได้ดีเพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถลดต้นทุนที่ใช้ในการผลิตได้ (Kristjansson and Stetter, 1992; Herbert, 1992,)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส จากตัวอย่างดินและน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของไขมันในโรงงานผลิตปลากระป๋องเพื่อศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าและเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบไปประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากไขมันที่สกัดได้จาก บ่อน้ำบาด ทั้งนี้เพื่อการใช้ประโยชน์ของวัสดุเศษเหลือเป็นผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่าในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. วัสดุเศษเหลือของโรงงานปลาทูนำบรรจุกระป๋อง

กระบวนการผลิตปลาทูนำบรรจุกระป๋อง มีขั้นตอนการผลิตและวัสดุเศษเหลือดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งขั้นตอนการผลิตปลาทูนำบรรจุกระป๋องจะมีวัสดุเศษเหลือประกอบด้วย น้ำนึ่งปลาทูนำ เศษกระดูก หัว และเครื่องใน เป็นต้น ที่สามารถนำมาดัดแปลงเพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์ใหม่ ก่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรสัตว์น้ำอย่างคุ้มค่า

Prasertsan และคณะ (1988) ทำการสำรวจปริมาณวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลในจังหวัดสงขลา พบว่าส่วนใหญ่มีการใช้วัตถุดิบสูงถึง 135 ตันต่อวัน และให้ผลผลิตร้อยละ 35 ของปริมาณวัตถุดิบเริ่มต้น ส่วนที่เหลือเป็นวัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็งมีประมาณร้อยละ 25-30 ของวัตถุดิบเริ่มต้น ได้แก่ เศษกระดูก หัว เครื่องใน และหนังปลา ซึ่งสามารถส่งขายให้แก่โรงงานปลาป่น เพื่อทำเป็นอาหารสัตว์โดยตรง อีกส่วนหนึ่ง คือ วัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลวมีประมาณร้อยละ 30-35 ของวัตถุดิบ ได้แก่ เลือดปลา และน้ำนึ่งปลา ซึ่งยังไม่ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ และปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย (อริญ หันพงศ์กิตติกุล และคณะ, 2536)

2. ไขมันและน้ำมัน

ไขมันเป็นชื่อสามัญที่เรียกสารประกอบที่เป็นไตรกลีเซอไรด์ สารประกอบฟอสโฟลิปิด และสเตอรอล ประมาณ 95% ของไขมันที่บริโภคในอาหารเป็นไตรกลีเซอไรด์ ถึงแม้ว่ากรดไขมันจะไม่อยู่ในรูปของกรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิปิด โกลโคลิปิด หรือสเตอรอล อนุพันธ์ของกรดไขมันจะถูกจำแนกตามระดับความไม่อิ่มตัว ไตรกลีเซอไรด์ที่เป็นของแข็งหมายถึงไขมัน ขณะที่ไตรกลีเซอไรด์ของเหลวหมายถึงน้ำมัน ทั้งไขมันและน้ำมันมีค่าพลังงานเท่ากัน น้ำมันที่อิ่มตัวมีค่าพลังงานมากกว่าน้ำมันที่มีพันธะคู่ ในทางเคมีไตรกลีเซอไรด์สามารถจำแนกได้ตามความอิ่มตัวซึ่งมีทั้งไขมันอิ่มตัว ไขมันไม่อิ่มตัวหนึ่งตำแหน่ง และไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (ปีโยรส หงษาชาติ, 2546)

คุณลักษณะของน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมปลากระป๋องขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ คือ พันธุ์ปลาที่ใช้ตลอดจนกระบวนการผลิตที่แตกต่างกัน สำหรับอุตสาหกรรมปลากระป๋องในประเทศไทย ส่วนใหญ่จะเป็นการผลิตปลาทูนำบรรจุกระป๋อง ซึ่งมีสารอินทรีย์ในน้ำเสียปริมาณสูงจากของเหลวที่ได้จากการนึ่งปลา อย่างไรก็ตามได้มีการแยกน้ำนึ่งปลา และน้ำที่ใช้เป็นตัวถ่ายเทความร้อนออกจากน้ำเสียรวมแล้วจะพบว่าลักษณะของน้ำเสียจากกระบวนการผลิตปลาทูนำจะมีความเข้มข้น

ลดลง เนื่องจากในน้ำนึ่งปลา มีปริมาณของไขมันและโปรตีนสูงมาก ดังข้อมูลใน Table 1 แสดงลักษณะน้ำเสียจากกระบวนการผลิตปลาพู่หน้าเมื่อแยกน้ำนึ่งปลาและไม่แยกน้ำนึ่งปลา

น้ำเสียโรงงานแปรรูปอาหารทะเลประเภทปลาจะมีการสะสมของสารอินทรีย์ปริมาณสูงซึ่งเป็นพวกเศษเนื้อปลา ไขมัน น้ำมัน เป็นต้น ทำให้มีค่าบีโอดีและซีโอดีสูง โดยไขมันและน้ำมันจะถูกดักไว้ที่บ่อดักไขมัน ซึ่งเป็นบ่อแรกของน้ำทิ้ง โดยน้ำเสียจะไหลลงสู่กระบวนการบำบัด ปริมาณไขมันที่ถูกดักได้ภายในบ่อดักไขมันมีปริมาณมากจนหนา 1 ฟุต ด้านล่างของไขมันจะเป็นน้ำเสีย ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับน้ำเสียทั่วไป คือ มีสีดำคล้ำ มีกลิ่นของไขมันขนาดเล็กปนอยู่ กลิ่นเหม็น ฯลฯ และยังมีสารจำพวกเกลืออีกด้วย

ลักษณะน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมปลากระป๋อง โดยส่วนใหญ่จะมีค่าพีเอชของน้ำเสียค่อนข้างเป็นกลางอยู่ที่ 5.8-6.3 ตามข้อมูลการสำรวจน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมปลากระป๋อง (Table 2) จะเห็นได้ว่ากระบวนการนึ่งปลาจะมีน้ำทิ้งที่มีค่า BOD และค่า COD สูงกว่ากระบวนการอื่นๆ ซึ่งหมายความว่าในน้ำทิ้งมีสารอินทรีย์อยู่ปริมาณมาก โดยค่า BOD จะบ่งบอกถึงปริมาณสารอินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งสารอินทรีย์ที่อยู่ในน้ำเสียจากการผลิตปลากระป๋องส่วนใหญ่จะเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต อีกทั้งค่าปริมาณของไขมันและน้ำมันยังอยู่ในปริมาณที่สูงกว่ากระบวนการผลิตอื่นๆ อีกด้วย ซึ่งน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตทั้งหมดจะไหลรวมกันลงสู่บ่อบำบัดน้ำเสียบ่อแรกก็คือบ่อดักไขมัน ทำให้มีการกำจัดไขมันออกไปได้บ้าง แต่ถ้าหากเกิดการสะสมของไขมันเป็นเวลานานจะทำให้ไขมันและน้ำมันที่มีปริมาณมากส่งผลกระทบต่อตรงทางกายภาพ เช่น การบดบังแสง ขวางกั้นการเติมอากาศ อีกทั้งการที่มีค่า Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) หรือปริมาณสารอินทรีย์ในโตรเจนที่สูงอาจทำให้น้ำเสียขาดออกซิเจนและยากแก่การบำบัด เป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำไขมันกลับมาแปรรูปหรือใช้ประโยชน์ต่อไป

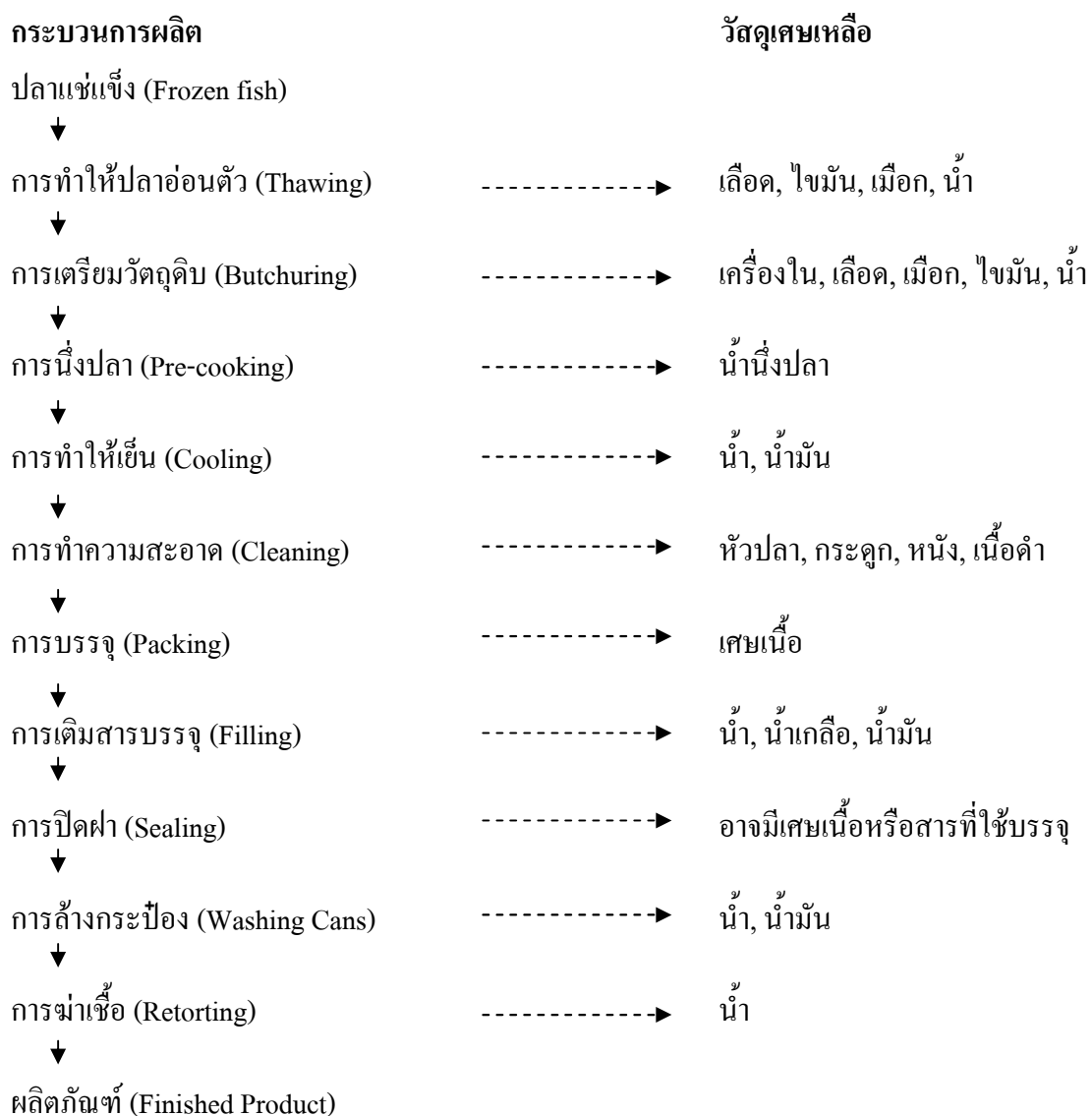


Figure 1. Flow chart of tuna canning process and waste from process.

Source: พูนสุข ประเสริฐสรรพ (2542)

Table 1. Characteristics of wastewater in tuna canning plant.

Parameters	wastewater	Tuna Pre-cooking water	
		include	exclude
BOD (mg/l)		7,313	5,196
TKN (mg/l)		890	564
TSS (mg/l)		2,233	971
F&G (mg/l)		5,523	5,318

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม (พ.ศ. 2537)

Table 2. Characteristics of wastewater at different steps of canned tuna processing.

Parameters	Processes			
	Thawing	Butchuring	Pre-cooking	Packing
pH	5.6-7.4	5.1-6.6	5.1-6.3	5.8-6.3
BOD (mg/l)	200-1,800	1,000-5,300	23,000-52,000	1,753
COD (mg/l)	400-3,200	2,400-7,200	41,000-74,000	2,573
F&G (mg/l)	100-5,100	1,000-9,400	4,000-56,000	6,504
TKN (mg/l)	20-250	90-600	4,800-8,200	290

ที่มา: กรมโรงงานอุตสาหกรรม (พ.ศ. 2537)

3. กรดไขมัน (Fatty acid)

กรดไขมันเป็นกรดอินทรีย์ประเภทหนึ่งส่วนใหญ่มีจำนวนคาร์บอน 4-24 อะตอม ปลายข้างหนึ่งมีหมู่คาร์บอกซิลและปลายอีกข้างมีลักษณะเป็นโซ่ยาวของนอนโพลาไรส์ไฮโดรคาร์บอน ซึ่งไฮโดรคาร์บอนทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ ในธรรมชาติกรดไขมันมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่และเป็นโซ่ยาวอิ่มตัว (ไม่มีพันธะคู่) หรือไม่อิ่มตัว (มีพันธะคู่) หรือมีสามพันธะ (triple bond) อยู่ 1 ตำแหน่งหรือมากกว่า กรดไขมันแต่ละชนิดมีความยาวของโซ่ จำนวนและตำแหน่งของพันธะไม่อิ่มตัวแตกต่างกัน กรดไขมันที่พบในเซลล์พืชหรือสัตว์จะไม่พบในรูปอิสระ แต่จะอยู่ร่วมกับลิพิดด้วยพันธะโคเวเลนต์ ซึ่งถูกย่อยสลายได้โดยการใช้เอนไซม์หรือสารเคมี

กรดไขมันที่พบในพืชและสัตว์ชั้นสูงจะมีจำนวนคาร์บอนอะตอมเป็นเลขคู่อยู่ระหว่าง 14-22 อะตอม โดยเฉพาะ C_{16} และ C_{18} พบมากที่สุด และถ้าหากมีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ ก็จะเป็นแบบนอนคอนจูเกต ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) โดยมีคอนฟิเจอร์ชันแบบซิส กรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวๆ ($C_{16}-C_{18}$) ละลายน้ำไม่ได้ แต่ถ้าในรูปเกลือสามารถสร้างไมเซลล์ในน้ำได้ และไมเซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ด้วยอันตรกิริยาแบบไฮโดรโฟบิก (อาภัสตรา ชมิคท์, 2537)

4. เอซิลกลีเซอรอล

เอซิลกลีเซอรอล หรือ ไขมันเป็นกลางเป็นเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับกลีเซอรอล ซึ่งเป็นแอลกอฮอล์และเป็นส่วนประกอบสำคัญของเนื้อเยื่อ พบได้ทั่วไปในน้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เอซิลกลีเซอรอลแบ่งออกเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) และโมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol)

4.1 ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์

ไตรเอซิลกลีเซอรอลหรือไตรกลีเซอไรด์เป็นเอซิลกลีเซอรอลที่พบมากที่สุด ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันที่มีพันธะเอสเทอร์กับหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสามหมู่ของกลีเซอรอล ถ้าเป็นกรดไขมันชนิดเดียวกันเรียกไตรกลีเซอรอลธรรมดา (simple triacylglycerol) เช่น ไตรปาล์มมิโตอิลกลีเซอรอล (triplamitoyl glycerol) แต่โดยทั่วไปจะประกอบด้วยกรดไขมันตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป เรียกว่า ไตรเอซิลกลีเซอรอลผสม (mixed triacylglycerol) เช่น 1-ปาล์มมิโตอิล ไดสเตียโรอิลกลีเซอรอล (1-plamitoyl distearoyl glycerol) (อาภัสตรา ชมิคท์, 2537)

4.2 โมโนและไดเอซิลกลีเซอรอล

โมโนและไดเอซิลกลีเซอรอลหรือ โมโนและไดกลีเซอไรด์เป็นเอสเทอร์ของกลีเซอรอลและกรดไขมันเพียงหนึ่งหรือสองโมเลกุล ตามลำดับ และมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ ถ้าเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระเหลืออยู่ 2 หมู่ เอซิลกลีเซอรอลทั้งสองไม่ค่อยพบมากในธรรมชาติ แต่จะพบเมื่อไขมันหรือน้ำมันเกิดการไฮโดรไลซิสที่ไม่สมบูรณ์ โดยจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้สังเคราะห์หรือดัดแปลงโครงสร้างไตรเอซิลกลีเซอรอลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือนำโมโนเอซิลกลีเซอรอลใช้เป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา และเครื่องสำอางชนิดต่างๆ (Rosu *et al.*, 1997)

5. การย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์

การย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ และสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา โดยส่วนใหญ่การย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น จุลินทรีย์จะมีการสร้างเอนไซม์และหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งการย่อยสลายไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์โดยเอนไซม์ไลเปสอาจเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือไม่สมบูรณ์ก็ได้ ถ้าการย่อยสลายที่ไม่สมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันกับโมโนกลีเซอไรด์หรือไดกลีเซอไรด์ก็เป็นได้ เมื่อไตรกลีเซอไรด์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กลีเซอรอลกับกรดไขมัน ในส่วนของกรดไขมันที่ได้จะเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายภายในเซลล์โดยผ่านวิถีเบต้า-ออกซิเดชัน (beta-oxidation) จนกระทั่งได้เป็นอะซิติลโคเอ (Acetyl-CoA) ดังแสดงใน Figure 2 และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) ต่อไป ส่วนกลีเซอรอลจะย่อยสลายจนกระทั่งเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้เป็นฟอสโฟอินอลไพรูเวท (phosphoenol-pyruvate) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป (Rehm and Reed, 1981)

เมื่อพิจารณากระบวนการย่อยสลายไขมันและน้ำมันจะเห็นได้ว่า การย่อยสลายจะเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อในกระบวนการสามารถเกิดกิจกรรมได้ 2 แบบ คือ กิจกรรมการย่อยสลายไขมันโดยการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและกิจกรรมของวิถีเบต้า-ออกซิเดชันซึ่งเป็นการย่อยสลายตามธรรมชาติ จากการศึกษาของ Chigusa และคณะ (1996) พบว่าจุลินทรีย์บางชนิดอาจมีคุณสมบัติในการเกิดกิจกรรมได้ดีทั้งสองแบบ จุลินทรีย์บางชนิดก็มีเพียงคุณสมบัติอย่างใดอย่างหนึ่งสูงแต่อีกอย่างหนึ่งต่ำ เช่น *Trichosporon capitatum*, *Candida viswanathii*, *Candida pseudolambica* จะมีกิจกรรมของวิถีเบต้า-ออกซิเดชันสูง ส่วน *Hansenula anomla* และ *Candida hellenica* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง

6. เอนไซม์ไลเปส

ไลเปส (EC 3.1.1.3: glycerol ester hydrolase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ที่มักจะเป็นโมเลกุลที่มีสายโซ่คาร์บอนของกรดไขมันที่ยาว ซึ่งไม่ละลายน้ำอยู่ในลักษณะอิมัลชัน (Robert, 1997) โดยเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ เช่น ไลเปสจาก *Bacillus subtilis* (Jaeger *et al.*, 1994) จะไฮโดรไลซ์โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันอิสระ โมโนกลีเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์และกลีเซอรอล โดยไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil-water interface (Forgarty, 1983; Macrae, 1983) และจากการค้นพบโครงสร้างสามมิติของไลเปส พบว่าบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์มีสายโพลีเปปไทด์ที่ทำหน้าที่เป็นฝาปิด (lid) ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับสับสเตรตได้เนื่องจากสายโพลีเปปไทด์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) เป็นส่วนใหญ่และขดตัวเป็นเกลียววนขวา (α -helical acid) แต่ฝาปิดนี้จะเปิดออกเมื่อสัมผัสกับบริเวณที่เป็นผิวสัมผัสระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมีกรดอะมิโนซีรีน (serine) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine) และกรดแอสพาทิก (aspartic acid) ที่เป็นตัวช่วยการทำงานของกรดอะมิโนซีรีนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Balcao *et al.*, 1996)

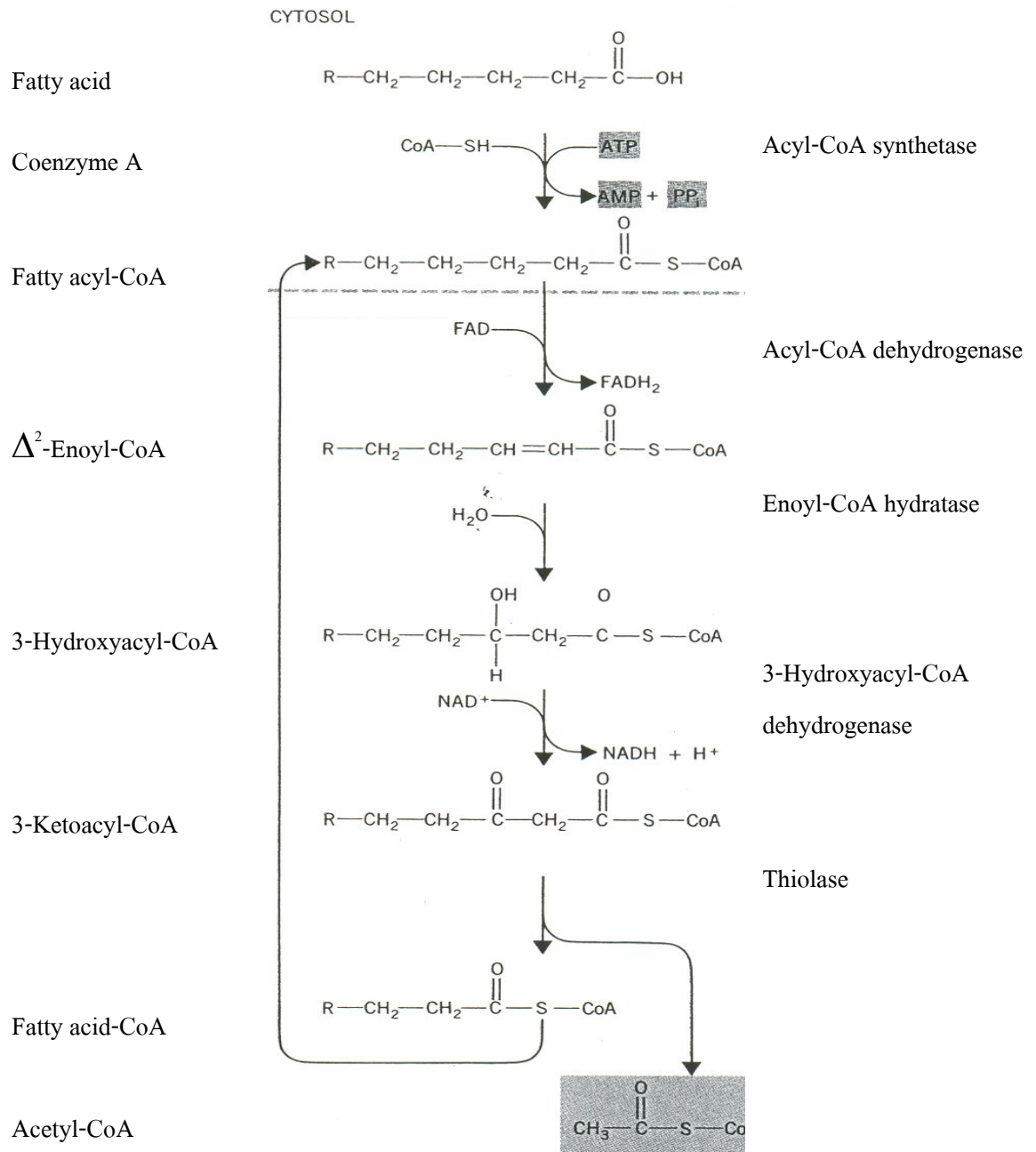


Figure 2. The pathway of lipid degrading by β -oxidation.

Source: Sheeler and Bianchi, 1987

7. แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ รา ยีสต์ และแบคทีเรีย (Jaeger *et al.*, 1994) และไลเปสบางชนิดได้มีการทำให้บริสุทธิ์ และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ในทางปฏิบัติไลเปสที่ผลิตด้วยจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในด้านการนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม (Onishi *et al.*, 1994; Wong, 1995) โดยตัวอย่างเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้มากทางการค้า ได้แก่ ไลเปสจากรา เช่น ไลเปสที่ผลิตโดย *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ไลเปสจากยีสต์ เช่น ไลเปสจาก *Candida cylindracea* (Hatzinikolaou *et al.*, 1999; Chen, 1996 อ้างโดย Gulati *et al.*, 1999)

7.1 ไลเปสจากสัตว์

ไลเปสที่ได้จากสัตว์พบได้ทั้งในเนื้อเยื่อสัตว์และอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อน กระเพาะอาหาร ลำไส้ หัวใจ ไต กล้ามเนื้อ และสมอง นอกจากนี้ยังพบไลเปสได้ในนมสัตว์ (Wong, 1995) ไลเปสจากตับอ่อนมี 2 รูปแบบ คือ ไลเปส-เอ และไลเปส-บี โดยระบบไลเปสในตับอ่อนนอกจากจะมีไลเปสแล้วยังมีโปรตีนอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 8,000 ดาลตัน มีหน้าที่ช่วยไลเปสในการย่อยไตรกลีเซอไรด์ (Shahani, 1975)

7.2 ไลเปสจากพืช

ไลเปสที่ได้จากพืชพบได้ทั้งในเนื้อเยื่อพืช ผัก ผลไม้ และในเมล็ดพืช โดยไลเปสจากพืชที่พบส่วนใหญ่จะพบในเมล็ดพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโอ๊ต (Kaur *et al.*, 1993) ไร่ข้าว เมล็ดปาล์ม เมล็ดขงพารา ถั่วเหลือง (Wong, 1995) ข้าวสาลี และเมล็ดละหุ่ง เป็นต้น โดยไลเปสที่ได้จากเมล็ดละหุ่งได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Shahani, 1975)

7.3 ไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าไลเปสที่ผลิตได้จากพืช และสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าพืชและสัตว์ การเพาะเลี้ยงไม่ขึ้นกับสภาพของภูมิอากาศ ประหยัดพื้นที่ในการผลิต ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยง และการเก็บเกี่ยวอีกทั้งความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ได้ก็สูงกว่า และเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้ความแตกต่างกันของคุณสมบัติเอนไซม์ไลเปสเนื่องจากจุลินทรีย์มีความหลากหลายอย่างมากไม่ว่าจะเป็นชนิด อย่างเช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย อีกทั้งยังหลากหลายตามแหล่งต่างๆ อุณหภูมิ อากาศ เป็นต้น จึงทำให้คุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น *Alcaligenes* sp. No. 679 (Kokusho *et al.*, 1982), *Bacillus* A30-1 (Wong *et al.*, 1995), *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al.*, 2000)

และ *Cryptococcus* sp. S-2 (Kamini *et al.*, 2000) จะผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง *Chromobacterium* sp. (Frost and Moss, 1987), *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 (Dharmsthiti and Kuhasuntisuk, 1998), *Mucor hiemalis f.hiemalis* (Hiol *et al.*, 1999) จะผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานในสภาวะเป็นกลาง *Rizopus chinesis* (Yasuda *et al.*, 1999), *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 (Ogino *et al.*, 2000) และ *Aspergillus nidulans* (Mayordomo *et al.*, 2000) จะผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด และ *Humicola lanuginosa* ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อน (Liu *et al.*, 1973) นอกจากนี้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย เช่น *Bacillus thermocatenulatus* จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส BTL-1 จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 7.0-8.0 และเอนไซม์ไลเปส BTL-2 จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 8.0-9.0 (Schmidt-Dannert *et al.*, 1996) และจากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ต่างชนิดกันจึงทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ (กิตติเดช, 2532) สำหรับขนาดโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ที่มีขนาดต่างๆ กัน เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *B. thermocatenulatus* จะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 16 kDa (Schmidt-Dannert *et al.*, 1994) ไลเปสจาก *A. nidulans* มีขนาดโมเลกุลประมาณ 29 kDa (Mayordomo *et al.*, 2000) และเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. THL 027 ซึ่งจะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 69 kDa (Dharmsthiti and Luchai, 1999) เป็นต้น ในบางกรณีพบว่าเอนไซม์ไลเปสจะมีขนาดใหญ่ เนื่องจากการรวมกันของโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้มีโมเลกุลใหญ่ (Lesuisse *et al.*, 1993) เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. THL 027 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ พบว่าเอนไซม์จะมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 200 kDa (Dharmsthiti and Luchai, 1999) เอนไซม์ไลเปสจาก *B. thermocatenulatus* จะมีน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่าจะมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 750 kDa (Schmidt-Dannert *et al.*, 1994)

8. ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

Malcata และคณะ (1992) แบ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มของลิปิด เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนกลีเซอไรด์ เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อโครงสร้างสเตอริโอไอโซเมอร์ของสับสเตรท และเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหลายๆ อย่างรวมกัน

Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จะเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลในปริมาณที่สูง แต่อาจจะพบไตรกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *C. cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเมื่อไตรกลีเซอไรด์ถูกย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมัน 2, 2-(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ว่า 2, 2-(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ จะไม่คงตัวถ้าปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานานเกินไปจะเกิดการย้ายหมู่เอซิลขึ้น ทำให้ได้เป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์ และจะถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอลในที่สุด ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้มาใช้ในการเพิ่มความเข้มข้นของ EPA และ DHA จากน้ำมันปลา เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *A. niger*, *Mucor javanicus* และพวก *Rhizopus* หลายสายพันธุ์ (Shimada et al., 1997)

กลุ่มที่ 3 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ไม่มีคุณสมบัติในข้อนี้ยกเว้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางพวก เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum candidum* ซึ่งมีความจำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวที่มีพันธะคู่เป็นคอนฟิเจอร์ชั้นแบบซิสอยู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่ 9 และ 10 ซึ่งปัจจุบันได้มีงานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและสุขภาพโดยให้ความสนใจเกี่ยวกับการเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมันปลาโดยเฉพาะ DHA และ EPA ซึ่งมีประโยชน์ต่อการพัฒนาของสมองและดวงตานั้นจะถูกนำไปพัฒนาในการเป็นอาหารเสริมในเด็กและผู้ใหญ่ กระบวนการเพิ่มความเข้มข้นของกรดไขมันจะต้องมีการใช้เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะกับสับสเตรทเพื่อทำปฏิกิริยาให้ได้ผลผลิตปริมาณมาก ยกตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

Jonzo (2000) ได้ทำการศึกษการใช้เอนไซม์ไลเปส 2 ชนิด คือไลเปส-เอ และไลเปส-บี ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ และรู้คุณสมบัติของเอนไซม์ โดยเอนไซม์นี้จะถูกผลิตจากเชื้อ *Candida rugosa* โดยนำมาตรึงบนคูโอไทต์-เอ 568 และใช้ในปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ิฟิเคชันของกลีเซอรอลกับกรดไขมันของน้ำมันปลาซาดีน พบว่าเอนไซม์ไลเปส-เอ และเอนไซม์ไลเปส-บี ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ิฟิเคชันของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวตำแหน่งเดียว โดยเพิ่มความ

เข้มข้นของ DHA ที่อยู่ในกรดไขมันอิสระ โดยไลเปส-บี ผลิตได้ 3.4 เท่าที่ 24 ชั่วโมง และไลเปส-เอ ผลิตได้ 4 เท่า ที่เวลา 10 ชั่วโมง ซึ่งจะมีการเกิด EPA ในปริมาณที่น้อยมาก การใช้ปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันในการเพิ่มความเข้มข้นของ DHA สามารถเพิ่มจาก 7.4 เป็น 32 เปอร์เซ็นต์ จากน้ำมันปลาซาดีนที่เก็บเกี่ยวมา 95 เปอร์เซ็นต์

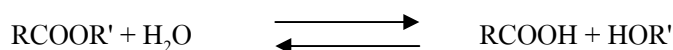
Liu และคณะ (2007) ได้ทำการสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลจากกลีเซอรอล และ n-3 ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid) ที่เข้มข้นโดยใช้เอนไซม์ ซึ่งได้ทำการสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลด้วย Novozyme 435 ในสถานะที่แตกต่างกันตามการออกแบบการทดลอง และได้เลือกปัจจัย 5 ปัจจัยในการหาสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ไลเปส พบว่าผลบ่งชี้ระดับการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่มีกลีเซอรอล 2.5 กรัม เฮกเซน 5 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำเริ่มต้นที่ 0.06 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ molecular sieves 1 กรัม ผลผลิตที่ได้จะเป็นของเหลวสีส้มโปร่งแสง ไม่มีกลิ่นน้ำมันปลา และระเหยเร็ว โดยมีส่วนประกอบของ DHA และ EPA เป็น 73.4 และ 13.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมี โมโนเอซิลกลีเซอรอล, ไดเอซิลกลีเซอรอล และไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งมี 12.1, 56.1, 31.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Ratchapol และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของโมโนเอซิลกลีเซอรอล ในกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายตำแหน่ง (polyunsaturated fatty acid) โดยเฉพาะ EPA และ DHA โดยการทำให้ปฏิกิริยาเอซิลเอโรไลซิสน้ำมันปลากับไลเปส AK จากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งจะถูกตรึงกับแอกูเรล อีพี-100 และพบว่า tert-Butyl methyl ester (MTBE) เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เมื่อทำการทดสอบคัดเลือกว่าตัวทำละลายอินทรีย์ตัวอื่นๆ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็นน้ำมันปลาทูน่า 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรใน MTBE อัตราส่วนโมลของกลีเซอรอลต่อน้ำมันปลาทูน่าเป็น 3:1 ปริมาณน้ำ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักในกลีเซอรอล และเอนไซม์ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งคิดจากน้ำมันปลาทูน่า อุณหภูมิคงที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่าการทำให้ปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณของโมโนเอซิลกลีเซอรอลเป็น 24.6 เปอร์เซ็นต์ แต่มี PUFA อยู่ 56.0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (EPA และ DHA) และได้มีการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ โดยที่กิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์จะยังคงมีเหลือ 88 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมเริ่มต้นหลังจากบ่มใน MTBE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนค่า K_m และ V_m ของปฏิกิริยาเอซิลเอโรไลซิสโดยใช้เอนไซม์กับน้ำมันปลาทูน่าใน MTBE เป็น 19.5 มิลลิโมลาร์ และ 2.71 มิลลิกรัมของโมโนเอซิลกลีเซอรอลต่ออนาที ตามลำดับ

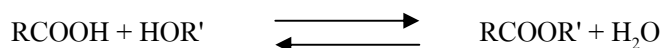
9. การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสละลายน้ำได้แต่สับสเตรทของเอนไซม์ไลเปสซึ่งได้แก่ ไขมันและน้ำมันมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจึงเกิดได้เฉพาะที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างส่วนของน้ำกับสับสเตรทเท่านั้น ดังนั้นเพื่อให้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากขึ้นจึงต้องทำให้พื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทเพิ่มมากขึ้น (Macrae, 1983; Malcata *et al.*, 1992; Balcao *et al.*, 1996) สำหรับเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ โดยทั่วไปทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.6-8.5 มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง และส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ความคงตัวต่ออุณหภูมิขึ้นอยู่กับแหล่งที่ผลิต พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากสัตว์และพืช เนื่องจากความหลากหลายของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อ *Pseudomonas* สายพันธุ์ที่ทนต่อความร้อนได้ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิสูงได้ถึง 100 องศาเซลเซียส (Malcata *et al.*, 1992) Yamane (1987) แบ่งความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเอสเทอร์ (hydrolysis of esters) เป็นการย่อยสลายเอสเทอร์ด้วยน้ำได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันกับกลีเซอรอล แอลกอฮอล์ หรือไกลคอล เช่น เมื่อย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันกับกลีเซอรอล

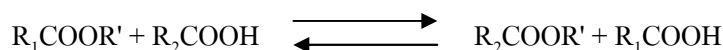


2. กลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ (Synthesis of esters) เป็นการสังเคราะห์เอสเทอร์จากกรดไขมันกับกลีเซอรอล แอลกอฮอล์ หรือไกลคอล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์กับน้ำซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของการย่อยสลายเอสเทอร์ (reverse of hydrolysis)

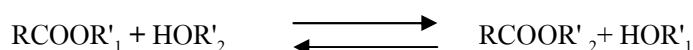


3. กลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) เป็นปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์ใหม่ โดยเกิดจากการย้ายหมู่เอซิลหรือกรดไขมันบนโมเลกุลของสารประกอบเอสเทอร์ไปสร้างพันธะใหม่กับโมเลกุลอื่น มี 4 ชนิด คือ

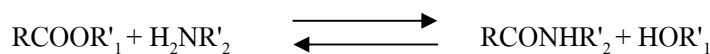
3.1 ปฏิกิริยาอะซิโดไลซิส (acidolysis)



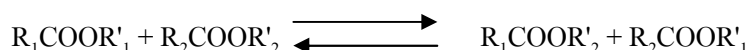
3.2 ปฏิกิริยาแอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis)



3.3 ปฏิกิริยาอะมิโนไลซิส (aminolysis)



3.4 ปฏิกิริยาอินเทอร์เอสเทอริฟิเคชัน (interesterification)



10. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลเปสโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสออกมาภายนอกเซลล์ เช่น *Bacillus* sp. 398 (Kim *et al.*, 1994), *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi *et al.*, 1990) เป็นต้น แต่บางพวกก็ผลิตเอนไซม์ไลเปสภายในเซลล์ เช่น *Alcaligenes denitrificans* (Odera *et al.*, 1986) บางพวกก็ผลิต cell-bound lipase เช่น *Streptococcus thermophilus* (Demoraes and Chandan, 1982)

พิจารณาช่วงการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลายระยะ log phase เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญสูงสุดจึงสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยแหล่งคาร์บอนที่คือน้ำมันมากที่สุด เช่น *Bacillus* sp. MC7 (Emanuilova *et al.*, 1993), *P. aeruginosa* (Stuer *et al.*, 1986) แต่จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเมื่ออยู่ในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) เช่น *Bacillus* sp. (Handelsman and Shoham, 1994), *Alcaligenes* sp. No 679 (Kokusho *et al.*, 1982) และ *Bacillus* sp. LBN4 (Bora and Kalita, 2007)

10.1 แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แตกต่างกัน และจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แตกต่างกัน Bora และ Kalita (2007) ศึกษาการผลิตและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. LBN4 พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำมันมะกอกให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดประมาณ 6.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสนั้นมากกว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล เช่น กลูโคส ซูโครส มอลโตส เป็นต้น ส่วน Kader และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส *Rhizopus* MR12 พบว่าเมื่อใส่มอลโตสร่วมกับน้ำมันมะกอกสามารถทำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้กิจกรรมสูงที่สุดประมาณ 0.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เนื่องจากเชื้อราสกุลนี้ต้องการคาร์โบไฮเดรตในการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วย Kiran และคณะ (2008) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. ที่แยกได้จากทะเล พบว่าสามารถใช้ไตรบิวไทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและให้กิจกรรมของไลเปสสูงกว่าการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่ง

คาร์บอน ส่วนเชื้อ *Vibrio* sp. TA43 ซึ่งคัดเลือกโดย วิภูมิ แก้วทอง (2539) ผลิตไลเปสได้สูงสุด 7.26 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรในแหล่งคาร์บอนแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์

10.2 แหล่งไนโตรเจน

Kumar และคณะ (2005) พบว่าเปปโตเนกับยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus coagulans* BTS-3 ซึ่งมีกิจกรรม 0.67 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร Falony และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *A. niger* ซึ่งพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด แหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. LBN4 คือ ยีสต์สกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (Bora and Kalita, 2007) ซึ่งสามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 3.4 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร Kader และคณะ (2007) ศึกษาแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเปปโตเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 567 ยูนิต์ต่อลิตร Ruchi และคณะ (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *P. aeruginosa* พบว่าการใช้ทริปโตเนร่วมกับยีสต์สกัดให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์สูงที่สุด ส่วน Nahas (1988) พบว่า *Rhizopus oligosporus* ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากขึ้น 5 เท่า เมื่อใช้กากถั่วเหลืองสกัดแทนยีสต์สกัด ส่วน กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย (2532) พบว่า $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส *P. aeruginosa* KM-2

10.3 แร่ธาตุ

Kumar และคณะ (2005) ศึกษาชนิดของแร่ธาตุต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. coagulans* BTS-3 พบว่า HgCl_2 มีบทบาทต่อกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเป็น 458 เปอร์เซ็นต์ Kader และคณะ (2007) พบว่าแคลเซียมคลอไรด์ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์จาก *Rhizopus* MR 12 สูงที่สุดประมาณ 20 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับ Bora และ Kalita (2007) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. LBN 4 มีกิจกรรมเทียบกับชุดควบคุมเป็น 140 เปอร์เซ็นต์ Kiran และคณะ (2008) พบว่า ZnCl_2 สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas* sp. เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเป็น 134 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการที่มี Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} และ Sn^{2+} มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ไลเปส *Humicola lanuginosa* No.3 เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , และ Co^{2+} ไม่ได้ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Omar et al., 1987) ส่วนพงษ์ชาริน โล่ห์ตระกูล (2538) พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหาร nutrient broth สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไลเปสของ *Aeromonas sobria* LP 004 โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มจาก 42.15 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ไปเป็น 109.47 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

10.4 อุณหภูมิ, พีเอชและการให้อากาศ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสที่แตกต่างกัน เช่น *Bacillus alcalophilus* (Ghanem *et al.*, 2000) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 60 องศาเซลเซียสและพีเอชที่ 10.6 ส่วน *Bacillus* sp. RSJ1 (Sharma *et al.*, 2002) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส *B. coagulans* BTS-3 มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 55 องศาเซลเซียสและพีเอชที่ 8.5 (Kumar *et al.*, 2005) *Antrodia cinnamomea* (Shu *et al.*, 2006) มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมที่ 25 องศาเซลเซียส และพีเอชเท่ากับ 8 จากการศึกษากของ Bora และ Kalita (2007) พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. LBN 4 คือ 65 องศาเซลเซียสและพีเอช 8.0 ส่วน *Pseudomonas* sp. (Kiran *et al.*, 2008) มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 30 องศาเซลเซียสและพีเอชค่อนข้างเป็นด่างที่ 8.0 ในบางครั้งการผลิตไลเปสมีผลกระทบโดยการให้อากาศ เช่น การกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์แก่ *P. aeruginosa* EF 2 ทำให้กิจกรรมของไลเปสลดลง (Gilbert *et al.*, 1991)

11. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส

11.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกัน แต่เอนไซม์อาจจะไม่คงตัวที่ระดับที่อุณหภูมิที่มีกิจกรรมสูงสุด เช่น *B. alcalophilus* ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สามารถทนต่ออุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ที่เวลามากกว่า 1 ชั่วโมง (Ghanem *et al.*, 2000) *Bacillus* sp. LBN 4 (Bora and Kalita, 2007) สามารถคงกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเมื่อผ่านไป 20 นาที โดยมีกิจกรรมเหลืออยู่ 80 เปอร์เซ็นต์ และ Kumar และคณะ (2005) พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถคงกิจกรรมของเอนไซม์เหลือครึ่งหนึ่งที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหลังจาก 2 ชั่วโมง ส่วน *A. cinnamomea* (Shu *et al.*, 2006) สามารถมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและคงตัวมีกิจกรรมเหลืออยู่ที่ 25-40 องศาเซลเซียส อยู่ 50 เปอร์เซ็นต์

11.2 พีเอช

ค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันทั้งนี้เนื่องจากปริมาณความเข้มข้นและประจุของอะมิโนบางชนิดบนสายโปรตีนแตกต่างกัน สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชใกล้เคียงกับค่า isoelectric point ของเอนไซม์จะมีผลต่อกิจกรรมอย่างมากโดยทำให้ความหนาแน่นของประจุบริเวณเร่งลดลงอย่างมาก มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยไลเปส

จากจุลินทรีย์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงส่วนใหญ่มีกิจกรรมสูงที่สุดก่อนไปทางกรด เช่น *Aeromonas sobria* LP 004 และ *Pseudomonas cepacia* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 6.0 ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 5.5-6.5 ที่ 50 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ความแตกต่างของคุณสมบัติของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแหล่งต่างๆ ตามลำดับ (พงศธราริน โลห์ตระกูล, 2538; Sugihara *et al.*, 1992)

ส่วนความคงตัว พบว่าเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่มีความคงตัวในพีเอชช่วงกว้าง เช่น ไลเปสจาก *B. coagulans* BTS-3 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 8-10.5 เมื่อบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Kumar *et al.*, 2005) ส่วน *A. cinnamomea* (Shu *et al.*, 2006) มีความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชในช่วง 7-10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และกิจกรรมเหลือ 30 เปอร์เซ็นต์เมื่อมีพีเอช 10-12 ซึ่งจัดได้ว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่มอัลคาไลน์ไลเปส *Pseudomonas* MSI057 (Kiran *et al.*, 2008) คงกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 89 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 8-9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

11.3 ไอออนของโลหะ และ reagents ต่างๆ

Wang และคณะ (1988) ได้สรุปสมมุติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออนต่อการส่งเสริมการทำงานของไลเปสไว้ 3 ประการ คือ แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ให้ทำงานได้ดียิ่งขึ้น ช่วยเพิ่มการดูดซึมของไลเปสที่ oil-water interface และช่วยขจัดกรดไขมันออกจาก oil-water interface ทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น

โดยทั่วไปไอออนของโลหะ เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{2+} , Li^{2+} , Hg^{2+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสโดยไอออนจะเพิ่มอัตราการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ซึ่งจะไปจับกับกรดไขมันอิสระและย้ายผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นออกจากบริเวณที่รบกวนการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ทำให้เอนไซม์ไลเปสทำงานได้ดีขึ้นและเนื่องจากพื้นผิวของโปรตีนเต็มไปด้วยประจุและกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำทำให้อิออนของโลหะหาบริเวณที่จับกับสับสเตรทประกอบด้วย กรดแอสพาทิก กรดกลูตามิกได้ง่ายขึ้น และไม่ว่าการจับกันจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ไลเปสหรือไม่ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งการจับกับของอิออนกับบริเวณเร่งของไลเปส (ณัญภัทร จินดา, 2549) เช่น Hg^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} และ K^{+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกผลิตจาก *B. coagulans* BTS-3 โดยพบว่า Hg^{2+} สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเป็น 458 เปอร์เซ็นต์ (Kumar *et al.*, 2005) ส่วน Zn^{2+} และ Co^{2+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* MSI057 โดยขณะที่ Hg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} และ Cu^{2+} ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Kiran *et al.*, 2008) อีกทั้ง Ca^{2+} , Na^{2+} , K^{2+} และ Co^{2+} มีผลกระตุ้นกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ได้เล็กน้อยประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Ba^{2+} กระตุ้นกิจกรรมของไลเปสได้ถึง 32 เปอร์เซ็นต์ (Handelsman and Shoham, 1994) และมีรายงานว่า Ca^{2+} มีผลต่อกิจกรรมของไลเปสจาก

H. lanuginose No.3 เพิ่มขึ้นเป็น 59.7 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 23.3 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร (Omar *et al.*, 1987) ส่วนใน *A. sobria* LP 004 พบว่า Ca^{2+} ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงที่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (พงศธราริน โล่ห์ตระกูล, 2538) Dutta และ Ray (2009) พบว่า Ca^{2+} , Co^{2+} และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus cereus* C7 มากขึ้น

บางครั้งมีรายงานว่าไอออนของโลหะไม่มีผลกระตุ้นกิจกรรมของไลเปส เช่น Sugihara และคณะ (1991) พบว่า Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} และ Ba^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. และพบว่า Ca^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi *et al.*, 1990) แต่ไลเปสส่วนใหญ่ถูกยับยั้งด้วยไอออนของโลหะหนักพวก Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} และ Hg^{2+} เช่น *H. lanuginose* (Omar *et al.*, 1987) *Bacillus* sp. (Sugihara *et al.*, 1991) และ *Flavobacterium odoratum* (Labuschagne *et al.*, 1997) Dutta และ Ray (2009) พบว่า Mn^{2+} , Fe^{3+} และ Sn^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสบริเวณแคตาไลติกไซต์ของ *Bacillus cereus* C7 ส่วน Alkan และคณะ (2006) รายงานว่าไอออนของโลหะจะไปจับอย่างแน่นบริเวณที่จำเพาะบนผิวของโมเลกุลและมีผลต่อการฟอร์มตัวของเปปไทด์อีกด้วย

ในบางครั้งพบว่าสารจับโลหะ (metal chelating agent) เช่น EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ไม่มีผลต่อไลเปส เช่น ไลเปสจาก *Bacillus* sp. (Sugihara *et al.*, 1991), *P. cepacia* (Sugihara *et al.*, 1992) ซึ่งให้เห็นว่าไลเปสเหล่านี้ไม่ใช่ metalloenzyme แต่ Muderhwa และ Ratamahenina (1985) พบว่า EDTA และ pCMB (parachloromercuribenzoate) ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Candida deformans* CBS 2701 ซึ่งสอดคล้องกับ Yamamoto และ Fujiwara (1988) ซึ่งพบว่า EDTA และ pCMB ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp.

11.4 ลักษณะของสับสเตรท (Physical state of substrate)

การทำงานของไลเปสจะเกิดขึ้นเมื่อไลเปสถูกดูดซับที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ (oil-water interface) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจึงขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของไลเปสที่ถูกดูดซับไว้ และขึ้นกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทด้วย ถ้าพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทมีมากขึ้น การทำงานของไลเปสจะดีขึ้นด้วย (Shahani, 1975)

11.5 ตัวทำละลายอินทรีย์

Sugihara และคณะ (1991) พบว่าอะซิโตน 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ช่วยเพิ่มกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเข้มข้นของอะซิโตนมากกว่า 60

เปอร์เซ็นต์ จะทำให้กิจกรรมของไลเปสลดลงอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากที่อะซิโตนเข้มข้นต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ทำให้พื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทมีมากขึ้น ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นโดยปราศจากการเสียสภาพของโปรตีน ส่วนอะซิโตนที่ความเข้มข้นมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพและสูญเสียกิจกรรม ส่วนเฮกเซนยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 5-100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในเชื้อ *P. cepacia* การเติม dimethylsulfoxide หรือ อะซิโตน 0-35 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่เบนซีนและเฮกเซนมีผลยับยั้ง (Sugihara *et al.*, 1992) Kiran และคณะ (2008) รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas sp.* (MSI057) มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์อย่างอะซิโตนที่ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นจากชุดควบคุมเป็น 124 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Ruchi และคณะ (2008) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* มีความเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์พวก xylene, cyclohexane, hexane และ heptane โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์คงเหลือเป็น 125, 168, 183 และ 175 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

11.6 Emulsifying agent

Sodium taurocholate เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิฟายเออร์จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เอสและเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Handelsman and Shoham, 1994) แต่อิมัลซิฟายเออร์ไม่ได้ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสเสมอไป Watanabe และคณะ (1977) พบว่าทั้งสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) และเกลืออนินทรีย์จะยับยั้งกิจกรรมของไลเปสชอบด่างจาก *Pseudomonas fragi* และ *Pseudomonas nitroreducens nov. var. thermotolerans*

12. การนำไลเปสไปใช้ประโยชน์

ไลเปสที่ได้จากพืช สัตว์และจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากหลายในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ โดยเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นที่สนใจมากที่สุดในการนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรม เนื่องจากไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีคุณสมบัติในการทำงานและความคงตัวที่ต่างกัน โดยประโยชน์ของไลเปสมีดังนี้

12.1 การย่อยสลายไขมัน

เอนไซม์ไลเปสจะสามารถย่อยสลายไขมันหรือน้ำมันให้ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม เช่น การนำกรดไขมันมาใช้ในการผลิตสบู่ โดยไลเปสที่ใช้สำหรับวัตถุประสงค์นี้ได้มาจาก *C. rugosa* (Hoq *et al.*, 1985) และในปัจจุบันได้มีการสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดไขมัน และกลีเซอรอลในทางอุตสาหกรรม

มากขึ้น โดยได้มีการใช้เอนไซม์ไลเปสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงในการย่อยสลายไขมันจากสัตว์ ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูง (Garcia *et al.*, 1995)

12.2 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง

ในกระบวนการผลิตเครื่องหนังจะมีขั้นตอนการเอาไขมันส่วนที่เหลือ และโปรตีนที่เสียบรูปที่ติดอยู่บริเวณหนัง และขนออก ซึ่งการกำจัดไขมัน และโปรตีนออกจากหนังสัตว์โดยวิธีทางเคมีจะมีประสิทธิภาพต่ำ (Seitz, 1974) แต่ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ในการกำจัดไขมัน และโปรตีนออกไปจากหนังสัตว์ (Posorske, 1984; Figurin *et al.*, 1990; Christner *et al.*, 1991; Gandhi, 1997)

12.3 การบำบัดของเสีย

ได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดของเสียในกระบวนการบำบัดแบบให้อากาศซึ่งในกระบวนการบำบัดของเสียแบบให้อากาศจะเกิดแผ่นคราบไขมันบริเวณผิวสัมผัสของๆ เสียกับอากาศทำให้การถ่ายเทอากาศเป็นไปได้ไม่ดีซึ่งในอดีตได้ทำการแก้ไขปัญหาโดยการตักเอาคราบไขมันออก แต่พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสนั้นจะให้ผลที่ดีกว่า โดยเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการบำบัดของเสียนี้ได้จาก *C. rugosa* ซึ่งต่อมาได้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อตัวนี้ในระดับอุตสาหกรรม โดยมีชื่อทางการค้าว่า Lipase-MY และได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียในประเทศอเมริกา (Seitz, 1974; Gandhi, 1997) นอกจากนี้ยังอาจนำไลเปสมาใช้ในการควบคุมการย่อยสลายของเสียในกระบวนการบำบัดแบบไร้อากาศได้ (Godfrey and Reichelt, 1983)

การใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในระบบบำบัดน้ำเสีย ซึ่งใช้ในการย่อยสลายไขมัน โดยสามารถคัดแยกได้จากแหล่งดินต่างๆ ไปที่มีการปนเปื้อนของไขมันหรืออาจแยกจากน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของไขมันรวมถึงระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานอาหาร ร้านอาหาร บ้านเรือน และแหล่งชุมชนต่างๆ Cappe และคณะ (1994) ได้ทำการแยกเชื้อ *Acinetobacter* sp. จากระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกซิเวเตสตัดจ์ พบว่าเชื้อดังกล่าวมี 4 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงคือ สายพันธุ์ SY1, STD, BO2 และ IB2 และพบว่าเชื้อสายพันธุ์ BO2 และ IB2 ยังสามารถย่อยสลายไขมันในช่วงอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส จึงมีการนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาใช้ในการย่อยสลายไขมันในระบบบำบัดน้ำเสียต่อไป นอกจากนี้แล้วยังมีผู้ศึกษาคัดแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไขมันในน้ำเสียได้อีกหลายสายพันธุ์ รวมถึงการทดลองนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้งในรูปแบบเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อผสมมาศึกษาการย่อยสลายไขมัน เพื่อหาความเป็นไปได้ในการนำเชื้อมาใช้ในการกำจัดไขมันอย่างจริงจัง

Wakelin และ Forster (1997) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์และจุลินทรีย์ผสมที่คัดแยกจากบ่อดักไขมัน (grease trap) และระบบบำบัดน้ำเสียแบบแอกติเวเตดสลัดจ์ พบว่าจุลินทรีย์ในรูปผสมมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดีกว่าจุลินทรีย์บริสุทธิ์ โดยมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไขมันเริ่มต้น 8 กรัมต่อลิตร

12.4 การใช้เป็นส่วนผสมของสารซักล้าง (Detergent)

ปัญหามลภาวะทางน้ำเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญมากโดยได้มีการพยายามที่จะลดการใช้สารทำความสะอาดที่มีสารเคมีที่ย่อยสลายได้ยาก โดยธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีการนำเอาเอนไซม์ไลเปสมาใช้เป็นส่วนผสมในการซักล้างเพื่อลดปริมาณสารเคมีที่เป็นส่วนผสมให้ลดน้อยลงและอุตสาหกรรมสารซักล้างมากมายที่ได้นำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในการผลิตสารซักล้างที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ได้นำมาใช้เป็นส่วนผสมนั้นได้มาจาก *Chromobacterium viscosum* (Minoguchi and Muneyuki, 1989; Gandhi, 1997) และ *Candida* (Nishioka, 1990)

12.5 การสร้างกลิ่นรสในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์จากนม

ได้มีการใช้ไลเปสเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์จากนมต่างๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาการีน นอกจากนี้ยังใช้ในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของนมซึ่งเป็นผลมาจากไขมัน โปรตีน และน้ำตาลแลคโตสที่มีอยู่ในน้ำนม และนอกจากนี้แล้วยังได้นำเอนไซม์ไลเปสมาร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในการตกตะกอนนมและปรับปรุงกลิ่นรสของนมและยังได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในขบวนการผลิตครีมเทียมให้มีกลิ่นรสที่ดีขึ้น

12.6 การผลิตไบโอดีเซล

ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันเชื้อเพลิงที่ผลิตมาจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ โดยผ่านขบวนการที่ทำให้โมเลกุลเล็กลง ให้อยู่ในรูปของ เอทิลเอสเทอร์ (Ethyl esters) หรือ เมทิลเอสเทอร์ (Methyl esters) ซึ่งจะถูกเน้นไปที่เมทิลเอสเทอร์ของกรดไขมัน โดยใช้กรดไขมันในไขมันและน้ำมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับเมทานอล ผลผลิตที่ได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากสามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยตรง การผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสเกิดจากการทำปฏิกิริยาเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ ข้อดีของการใช้ไบโอดีเซลมีมากมาย เช่น สามารถลดการนำเงินตราออกนอกประเทศโดยการลดปริมาณการซื้อน้ำมันดิบจากประเทศผู้ผลิตน้ำมันได้อย่างมหาศาล ยิ่งกว่านั้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันดีเซล การใช้ไบโอดีเซลช่วยรักษาสภาพสิ่งแวดล้อมให้ดีขึ้นได้เพราะเป็นเชื้อเพลิงสะอาด

13. การใช้ประโยชน์จากกรดไขมัน

กรดไขมันใช้เป็นวัตถุดิบในการเริ่มต้นสำหรับการผลิตกรดไขมันอิสระ เอสเทอร์ของกรดไขมัน ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบโดยตรงหรือนำไปดัดแปลงหมู่โครงสร้างเพื่อผลิตสารอนุพันธ์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย วิธีการง่ายที่สุดในการผลิตกรดไขมัน คือ การใช้อุณหภูมิและความดันสูงในการแยกไขมันและน้ำมัน สารผสมของกรดไขมันสามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้โดยการกลั่น กรดไขมันที่แยกได้สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ยาง เทียนไข และเครื่องสำอางได้โดยตรง (Hui, 1996)

ในอุตสาหกรรมการผลิตยาง กรดไขมันจะถูกเติมลงในระหว่างขั้นตอนการผลิตเพื่อทำหน้าที่เพิ่มความนุ่ม สารหล่อลื่น และทำหน้าที่ช่วยลดเวลาในการให้ความร้อน โดยความยาวของกรดไขมันไม่มีผลต่อการทำหน้าที่ดังกล่าว แต่กรดไขมันที่มีความอิ่มตัวสูงอาจมีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตได้ การผลิตเทียนไขได้มีการนำกรดไขมันจากน้ำมันปาล์มมาเพื่อใช้เพิ่มคุณสมบัติในด้านความเหนียวทำให้ง่ายต่อการดึงออกจากแก้ว ซึ่งอัตราส่วนเหมาะสมของกรดไขมันที่ใช้ คือ C_{16} ต่อ C_{18} ในอัตราส่วน 7:2 ดังนั้นจึงมีการนำน้ำมันปาล์มสเตียรีนมาใช้เนื่องจากมีปริมาณกรดพาล์มิติกสูง นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดไขมันในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง ชนิดของกรดไขมันที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ กรดไมริสติก กรดพาล์มิติก และกรดสเตียริก วัตถุประสงค์ของการนำมาใช้เพื่อช่วยการเป็นฟอง เพิ่มความเป็นเงา และทำหน้าที่เป็นคอนดิชันเนอร์ (Hui, 1996)

นอกจากนี้มีการนำกรดไขมันที่ได้จากมะพร้าวมาใช้อุตสาหกรรมสบู่และน้ำยาซักฟอกมากยิ่งขึ้น กรดริซิโนเลอิกที่พบในน้ำมันละหุ่งเป็นกรดไขมันที่ใช้ในอุตสาหกรรมสีย้อมและจารบี (ปวีณา พงษ์คนตรี, 2547)

14. แวกซ์เอสเทอร์

แวกซ์ หมายถึง สารใดๆ ที่มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง เช่น พาราฟินแวกซ์ (สารผสมไฮโดรคาร์บอน) แต่ในทางเคมีแวกซ์ หมายถึง เอสเทอร์ที่เกิดจากการรวมตัวระหว่างไฮโดรคาร์บอนที่มีโซ่ยาวกับกรดไขมันที่มีโซ่ยาว มีสูตรทั่วไป คือ $RCOOR'$ โดยที่ R' เท่ากับ C_{24} ถึง C_{36} และมักจะเป็นสายโซ่ที่อิ่มตัว แต่ถ้ามีพันธะคู่ก็มักจะมีในบางส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ คือ R'

14.1 คุณสมบัติของแวกซ์

แวกซ์เป็นสารที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เป็นของแข็งที่อุณหภูมิห้องเป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันสายยาวและแอลกอฮอล์ของกรดไขมันสายยาว

มีกลิ่น สีเฉพาะตัว ติดไฟได้ มีสมบัติเป็นไดอิเล็กตริกที่ดี ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ละลายน้ำ

14.2 ประเภทของแว็กซ์ (ศุภรินทร์, 2541)

14.2.1 แวกซ์จากพืช

เป็นแว็กซ์ที่เกิดจากพืช พบจากพืชได้หลายชนิดที่มีอยู่แทบทั่วโลก แล้วแต่ว่าแว็กซ์ชนิดใดที่มีประโยชน์และมีคุณภาพดี แวกซ์จากพืชที่ควรรู้จักมีดังนี้

1. Bayberry Wax เอามาจากเปลือก *Myrica cerifera* ส่วนมากพบที่ประเทศอเมริกา บางตัวของ *myrica* พบที่แหลมกูคโฮบ หลอมเหลวที่อุณหภูมิ 40-44 องศาเซลเซียส มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.97-0.99 มีค่าดัชนีหักเห (refractive index) เท่ากับ 1.4363 ที่ 80 องศาเซลเซียส ใช้ในการทำเทียนไข ทำยา

2. Candelilla Wax พบจากการขับออกของ *Cuphorbia qatisyphilitica* ซึ่งมีอยู่ทางตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกและทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา จากไขของต้นไม้ชนิดนี้ถ้าเรานำมาต้มกับน้ำ และใส่กรดซัลฟูริกเข้มข้นลงไปเล็กน้อย จะได้แว็กซ์ 2-3 เปอร์เซนต์ ซึ่งสามารถละลายในคาร์บอนเตตระคลอไรด์ มีสีเหลืองปนน้ำตาล มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{30}H_{62}$ จุดหลอมเหลว 62 องศาเซลเซียส ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.983-1.00 ค่าดัชนีหักเหเท่ากับ 1.4555 ที่ 71 องศาเซลเซียส ใช้ทำเทียนไข น้ำมันขัดเงา เป็นต้น

3. Chinese Wax พบอยู่ตามกิ่งของ *Fraxinux chinensis* พบมากที่ประเทศจีน ใช้ทำเทียนไข น้ำมันขัดเงา มีสีขาวหรือเหลือง ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.970

4. Coca Wax มีในใบพืชตระกูล *Erythoxyac* พบในประเทศอินโดนีเซีย ศรีลังกา เปรู โบลิเวีย บราซิล มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{33}H_{66}O_2$ หลังจากการทำบริสุทธิ์แล้วจะเป็นสีขาว จุดหลอมเหลวที่ 70 องศาเซลเซียส และละลายได้ในเอทานอลที่ร้อน ใช้ทำหมากฝรั่ง

5. Carnauba Wax ได้จากใบและเม็ดยของปาล์มที่มีในประเทศบราซิล และทางตอนใต้ของประเทศสหรัฐอเมริกา มีสีเหลืองอ่อนหรือสีเขียว มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.990-1.00 ที่ 15 องศาเซลเซียส ละลายได้ในเอทานอลที่ร้อน ซึ่งแว็กซ์ตัวนี้มีชื่อทางการค้าที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับเปอร์เซนต์ไฮโดรคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบใช้ทำประโยชน์ เช่น ทำเทียนไข น้ำมันขัดรองเท้า

6. Japan Wax ได้จากผลของ *rhus succedanea* พบในประเทศญี่ปุ่น อินเดีย ตะวันออก อินโดจีน ไม่ใช่แว็กซ์ที่แท้จริง แต่เป็นกลีเซอไรด์ มีสีเหลือง มีจุดหลอมเหลวที่ 53 องศาเซลเซียส ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.970-0.980 ใช้ทำสบู่ ไม้ขีดไฟ เทียนไข สารขัดเงา

7. กลีเซอไรด์แวกซ์ พบจากเปลือกของ cane glass ในประเทศออสเตรเลีย มีส่วนผสมแบบเดียวกันกับ carnauba wax ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ มีจุดหลอมเหลวที่ 82 องศาเซลเซียส

8. Sugar cane Wax เป็นผลมาจากการสกัดน้ำตาลที่ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งได้จากอ้อย จะมีสีม่วงแยกโดยการคั้นจากน้ำอ้อยแล้วนำน้ำอ้อยมากรองโดยใช้เบนซอล (benzol) เป็นตัวทำละลาย มีสมบัติ คือ แข็ง มีสีเหลืองสามารถละลายได้ในน้ำร้อน มีจุดหลอมเหลวที่ 55-62 องศาเซลเซียส ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.961

9. Ocuba Wax ได้จากผลไม้พวก *Myristica ocuba officinalis* ซึ่งปลูกบนชายฝั่งของกลุ่มแม่น้ำอะเมซอน มีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.920 จุดหลอมเหลว 39.4 องศาเซลเซียส ในบราซิลใช้ทำเทียนไข

14.2.2 แวกซ์จากสัตว์

1. Wool fat ได้จากพวกขนแกะ ซึ่งไม่ค่อยจะบริสุทธิ์นัก ใช้เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอาง

2. Spermaceti ส่วนมากมีสีขาวพบมากในปลาวาฬ ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.945-0.960 จุดหลอมเหลว 44-47.5 องศาเซลเซียส ใช้ทำเทียนไข และสบู่

3. Bee Wax ได้มาจากพวกผึ้งงาน ตอนยังไม่ได้ฟอกสี เรียกว่า ขี้ผึ้งเหลือง เมื่อฟอกสีแล้ว เรียกว่า ขี้ผึ้งสีขาว ประโยชน์ในการทำเทียนไข เครื่องสำอาง เป็นต้น

4. Shellac Wax พบในประเทศอินเดียไม่ค่อยได้ใช้ประโยชน์ในทางการค้า สามารถใช้น้ำยาขัดเงาได้ มีจุดหลอมเหลวที่ 72-80 องศาเซลเซียส

14.2.3 แวกซ์จากแร่

Mineral Wax เป็นสารที่สกัดมาจากถ่านหินสีน้ำตาลและถ่านหินลิกไนต์ โดยการนำถ่านหินมาทำแห้งแล้ว ใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างแอลกอฮอล์และเบนซีน มีจุดหลอมเหลวที่ 84.0 องศาเซลเซียส ค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.00 ใช้ทำเทียนไข เป็นต้น

1. ปีโตรเลียมแวกซ์

เป็นแวกซ์ที่เกิดจากพวกพืชและสัตว์ เป็นแหล่งที่ใหญ่ที่สุดของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนของแวกซ์ ปีโตรเลียมแวกซ์เราใช้ประโยชน์ในงานที่สำคัญ คือ การทำกระดาษห่อขนม ทำเทียนไข ในอุตสาหกรรมปัจจุบันนี้แวกซ์ที่ใช้ในส่วนใหญ่มามากจากปีโตรเลียมแวกซ์ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และแวกซ์จากพืชและสัตว์ 10 เปอร์เซ็นต์

ปีโตรเลียมแวกซ์มีความแตกต่างกันในธรรมชาติ โดยส่วนประกอบของไฮโดรคาร์บอนที่เป็นพาราฟินโซ่ตรง และไอโซพาราฟินเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีชื่อเรียกต่างๆ กันไป

เช่น พาราฟินแว็กซ์ ไมโครคริสตัลไลน์แว็กซ์ (microcrystalline wax) ปีโตรลาทัมแว็กซ์ (petrolatum wax) ส่วนใหญ่มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_3(CH_2)_nCH_3$ เมื่อ $n > 18$ เป็นของแข็งที่อุณหภูมิปกติ (25 องศาเซลเซียส) และมีความหนืด 33-45 SUS ที่ 99 องศาเซลเซียส

ปีโตรเลียมแว็กซ์ สามารถแยกเป็นชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

ก. พาราฟินแว็กซ์ (paraffin wax)

ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอนชนิดอิ่มตัว (saturated hydrocarbon) ได้จากการกลั่นน้ำมันหล่อลื่นเบาและน้ำมันหล่อลื่นกลาง บางทีถูกเรียกว่าแว็กซ์ที่กลั่นได้ (distillate wax) ดัง Figure 3 ผลิตภัณฑ์ที่กลั่นออกมาได้เมื่อปล่อยให้เย็นลงจะมีจุดหลอมเหลวที่ 48-65 องศาเซลเซียส มีผลึกเป็นแผ่น ซึ่งเป็นพวกรวมอลพาราฟินเป็นส่วนใหญ่ มีไอโซพาราฟินและไซโคลพาราฟินปนอยู่ด้วย โดยปกติแล้วความยาวของสายโซ่โมเลกุลอยู่ในช่วง C_{22} - C_{30} มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 360-420 g/mol และเป็นผลึกชนิดหยาบหรือเป็นแผ่น พาราฟินแว็กซ์อาจแบ่งตามปริมาณน้ำมัน (oil content) ที่ยังคงผสมอยู่สามารถแบ่งย่อยได้อีกดังนี้

- Fully Refined Paraffin Wax จุดหลอมเหลว 50-71 องศาเซลเซียส ไม่มีปริมาณน้ำมันเลยหรือถ้ามีปริมาณน้ำมันบ้างต้องมีน้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และมีเบอร์สีเท่ากับ +21 หรือมากกว่า (ASTM 156-64) ซึ่งเบอร์สีจะถูกวัดโดยใช้ saybolt chromometer scale (ถ้าเป็นสีเหลืองจะมีค่าเท่ากับ 0 แต่ถ้าเป็นสีขาวใสจะมีค่าเท่ากับ +30) ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น เนื่องจากมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งใช้ในการเคลือบภาชนะบรรจุอาหาร อุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง

- Semi-refined Paraffin Wax หรือ Candle Wax มีปริมาณน้ำน้อยกว่า 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีเบอร์สีเท่ากับ +21 หรือต่ำกว่า จะมีสีคล้ำกว่า fully refined paraffin wax และยังมีสมบัติอื่นๆ ด้อยกว่าอีกด้วย

- Scale Wax มีปริมาณน้ำมัน 2-3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักหรืออาจสูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์ แว็กซ์ชนิดนี้มีจุดหลอมเหลวต่ำถึง 43 องศาเซลเซียส มีสีเหลือง และมีเบอร์สี +10

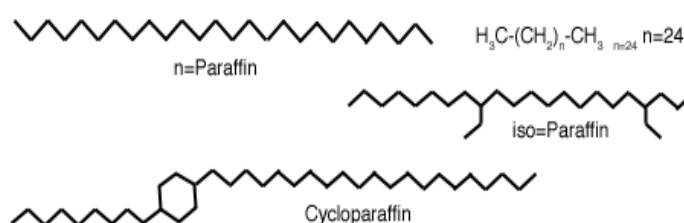


Figure 3. Chemical structure of paraffin wax

Source: Petroleum wax overview, 2009. (ออนไลน์). สืบค้นจาก:

<http://igiwax.com/wax-basics/overview/> (9 พฤศจิกายน 2552).

ข. ไมโครคริสตัลไลน์แว็กซ์ (microcrystalline wax)

ประกอบด้วยอัลเคนชนิดอิ่มตัวเป็นโซ่กิ่ง และ โมเลกุลเป็นวงกลมมากกว่าโมเลกุลโซ่ตรง มีจำนวนคาร์บอนอะตอมในสายโซ่ประมาณ 36-60 อะตอม ได้จากการนำน้ำมันหล่อลื่นหนักมากลั่น มีจุดหลอมเหลวช่วง 65-100 องศาเซลเซียส มีโมเลกุลใหญ่และมีความหนืดสูงกว่าพวกพาราฟินแว็กซ์ โดยปกติถ้าบริสุทธิ์จะมีสีขาว บางทีมีสีเหลือง สีทอง และสีน้ำตาล มีปริมาณน้ำมัน 0.5-5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 600-800 ทำให้ยากในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบ เป็นแว็กซ์ที่มีโมเลกุลโซ่กิ่งเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นทำให้แว็กซ์มีโครงสร้างเป็นแบบผลึกละเอียดขนาดเล็ก นำ slack wax ที่ได้จากการกลั่นหนัก (heavy distillation) หรือจากน้ำมันมาสกัดด้วยตัวทำละลายเอาน้ำมันออก ในส่วนของตัวสกัดจะมีน้ำมันปนอยู่จะนำมาผลิต ไมโครคริสตัลแว็กซ์ได้

ค. ปีโตรลาทัม (petrolatum หรือ petroleum jelly)

ประกอบด้วยไอโซพาราฟินและไซโคลพาราฟินเป็นส่วนใหญ่และมีอะโรมาติกปนอยู่บ้าง มีปริมาณน้ำมันสูง มีลักษณะเหนียวหนืด ปีโตรลาทัมประกอบไปด้วยไมโครคริสตัลไลน์แว็กซ์ แต่ไม่ใช่ว่าไมโครคริสตัลไลน์แว็กซ์เป็นปีโตรลาทัม ดังนั้นปีโตรลาทัมจึงขึ้นอยู่กับโครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุลของแว็กซ์มากกว่าจะขึ้นอยู่กับน้ำมันปีโตรเลียมที่สกัดแล้ว ปีโตรลาทัมสามารถผลิตมาจากส่วนน้ำมันหล่อลื่นหนัก (heavy lubricating oil cut) โดยวิธีการใช้ตัวทำละลายและตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง จะมีสถานะกึ่งแข็งกึ่งเหลวและความหนืดประมาณ 60-120 SUS ที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 43-79 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำมันมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ระวังการทำให้อายุสั้นขึ้นกับการนำไปใช้งาน ซึ่งต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสม

14.2.4 แว็กซ์สังเคราะห์ในทางเคมี

การสังเคราะห์แว็กซ์ทำได้หลายวิธี ดังต่อไปนี้

ก. โพลีเอธิลีนทำปฏิกิริยากับไฮดรอกซีกรุป จะได้โพลีเอธิลีนแว็กซ์ที่มีโมเลกุลประมาณ 2000

ข. เอธิลีนออกไซด์รวมกับไดไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ จะได้โพลีเอธิลีนแว็กซ์ไกลคอล

ค. ปฏิกิริยาคลอรีเนชันของเนฟทาลิน จะได้ซาโลแว็กซ์

ง. แว็กซ์ประเภทคีโตนมีทั้งที่เป็นสายโซ่และแบบเป็นวง (cyclic)

(1) จากคีโตนแบบเดียวกัน โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นกรดไขมัน

(2) จากคีโตนไม่ใช่แบบเดียวกัน ใช้วิธีฟรีเดลคราฟท์ของกรดไขมัน

จ. เอไมด์ (amide) ทำปฏิกิริยากับกรดไขมันทำให้สายโซ่ยาวขึ้นโดยใช้ความร้อน

จ. อิมไมด์ (imide) ซึ่งได้จากปฏิกิริยาการควบแน่น ระหว่างพาทาลิกแอนไฮไดรด์ (phthalic anhydride) กับอะลิฟาติกเอมีนปฐมภูมิ (primary aliphatic amine) จะได้พาทาลิมไมด์ (phthalimide) ใช้ในการจัดเงาและอุตสาหกรรมกระดาษ

15. การนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในการผลิตแวกซ์เอสเทอร์

การผลิตแวกซ์เอสเทอร์ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแวกซ์เอสเทอร์เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ หลายด้าน เช่น เป็นสารหล่อลื่น รักษาความชุ่มชื้น สามารถขึ้นรูปงานปั้นได้ และได้มีการศึกษาการผลิตแวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสได้รับความสนใจมากขึ้น โดยการทำปฏิกิริยาดัง Figure 4 แต่กระบวนการผลิตแวกซ์เอสเทอร์ที่ผ่านมาส่วนใหญ่เป็นการผลิตทางเคมี ซึ่งสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ปฏิบัติงาน อีกทั้งส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม (Figure 5) ส่วนกระบวนการผลิตโดยใช้เอนไซม์ไลเปส มีข้อดี คือ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ระยะเวลาในการผลิตสั้น ไม่สิ้นเปลืองพลังงาน

Poisson และคณะ (1999) ได้ศึกษาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากไขมันนมและโพลิอิลแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Alcaligenes* sp. และ *C. viscosum* ทำปฏิกิริยาโดยอัตราส่วนโมลของกรดไขมันและแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:1 ทำปฏิกิริยาใน eppendorf 1.5 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ไลเปส 30 มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 166 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตแวกซ์เอสเทอร์ได้ 65 เปอร์เซ็นต์

Salis และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จาก heavy fraction จากไขมันของน้ำมันแกะและซีทิลแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูป 2 ชนิด คือ Lipozyme RMIM และ Novozym 435 ทำการหั่น heavy triglyceride fraction 40.9 มิลลิกรัม (น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย = 706.1 กรัมต่อโมล) ละลายด้วยเฮกเซน 5 มิลลิลิตร ผสมกับซีทิลแอลกอฮอล์ 42.2 มิลลิกรัม เติมเอนไซม์ตรังรูป 50 มิลลิกรัม ทำปฏิกิริยาในหลอดฝาเกลียว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์ไลเปส Lipozyme RM IM สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุดที่ 84.1 เปอร์เซ็นต์ โดยได้ซีทิลพาล์มิเทด 41.9 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 5 ชั่วโมง

Radzi และคณะ (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มขนาดการผลิตแวกซ์เอสเทอร์ชนิดเหลวจากกรดโอลิอิกและโพลิอิลแอลกอฮอล์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูป ซึ่งจะทำการปฏิกิริยาในถังหมักขนาด 1 ลิตร พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิต 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของกรดโอลิอิกกับโพลิอิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 1:2 ปริมาณเอนไซม์ 90 กรัม เฮกเซน 600 มิลลิลิตร ความเร็ว 400 รอบต่อนาที และสามารถผลิตได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ได้อีก 6 ครั้ง

Nishio และ Kamimura (1985) ศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Pseudomonas fragi* 22.39B ในเฮกเซน โดยใช้กรดปาล์มิติกและซีทิลแอลกอฮอล์อัตราส่วน 1:1 ในเฮกเซน 20 มิลลิลิตร ปริมาณเอนไซม์ 10 มิลลิกรัม บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 100 รอบต่อนาที พบว่าสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ 6 ครั้ง ซึ่งให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ที่ 86 เปอร์เซ็นต์

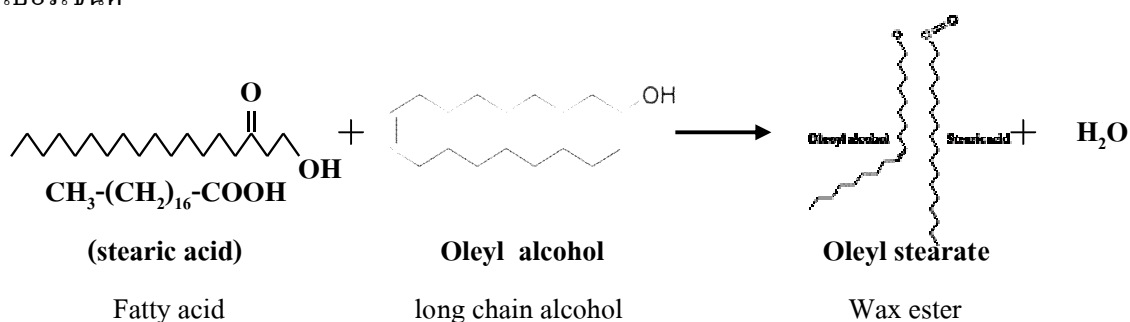


Figure 4. Wax esters synthesis by esterification of lipase.

Source: Modified from Herdt *et al.* (2009).

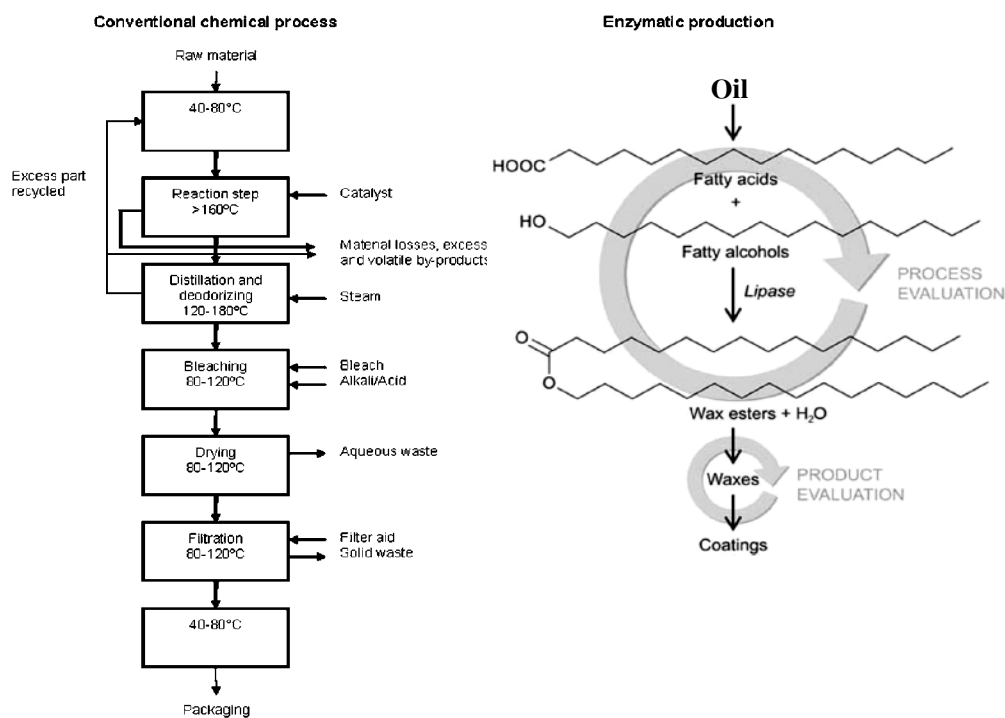


Figure 5. Wax esters production by chemical and enzymatic methods.

Source: Petersson *et al.* (2005).

16. การนำแว็กซ์เอสเทอร์ไปใช้ประโยชน์

1. อุตสาหกรรมเทียนไข (Candle marketing industries)

ในอุตสาหกรรมการทำเทียนไขจะใช้ปิโตรเลียมแว็กซ์มาเป็นอันดับหนึ่ง โดยปกติจะใช้พาราฟินแว็กซ์ประเภท fully refined paraffin wax เป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังเติมสารเติมแต่ง (additive) เช่น กรดสเตียริก (แว็กซ์สังเคราะห์) ปาล์มแว็กซ์ และไมโครคริสตัลแว็กซ์ ผลิตโดยการใช้แม่พิมพ์ แต่ในปัจจุบันโรงงานใหญ่ๆ มีการใช้วิธีอัดรีด (extrusion) กันอย่างกว้างขวาง

2. อุตสาหกรรมกระดาษ (paper industries)

ใช้เป็น sizing agent ซึ่งทำให้กระดาษมีคุณภาพที่ดีขึ้น เช่น ลดการม้วนงอของกระดาษ เพิ่มความต้านทานน้ำ หมึก และกรด นอกจากนี้ยังใช้ทำกระดาษผิวเป็นมัน และยังใช้ในการเคลือบเพื่อเพิ่มความแข็งแรง เช่นกระดาษไข เคลือบด้านในของกล่องบรรจุอาหาร

3. อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ (packaging industry)

สำหรับกระดาษที่ใช้ในการบรรจุภัณฑ์ (packaging paper) และหีบห่อ (wrapping paper) มักจะปรับปรุงคุณภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งกระบวนการนี้จะรวมไปถึงการทำกระดาษให้มีความต้านทานต่อน้ำและไอน้ำ นอกจากนี้ยังรวมไปถึงการเพิ่มการทนต่อแรงดึงให้กับกระดาษ

4. สารประกอบอุตสาหกรรมยาง (rubber compounding)

ปิโตรเลียมแว็กซ์ถูกใช้ในอุตสาหกรรมยาง เพื่อที่จะลดและป้องกันการแตกสลายเนื่องจากโอโซนของพันธะคู่ในโมเลกุลยาง โดยจะทำการละลายในยางที่ทำวัลคาไนเซชัน (vulcanization) แต่จะเข้ากันไม่ได้หรือไม่ละลายเมื่อมีอุณหภูมิต่ำลง ปิโตรเลียมแว็กซ์จะเกิดเป็นแผ่นเกาะที่ผิวหน้าของยางซึ่งคล้ายกับการป้องกันทางกายภาพจากการถูกโอโซนและอากาศ โดยปกติจะใช้ปิโตรเลียมแว็กซ์ชนิด พาราฟินแว็กซ์ในปริมาณ 0.1-3 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนัก

5. สารขัดเงา (polishes)

ปิโตรเลียมแว็กซ์สามารถใช้ผสมกับสารเคมีอื่นๆ เพื่อเป็นสารขัดเงาได้ โดยแว็กซ์จะกระจายอยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ระเหยได้ หรือกระจายอยู่ในตัวของเหลว (aqueous dispersions) เช่น ครีม

6. Wax emulsions

โดยการผสมแว็กซ์ที่หลอมเหลวกับน้ำที่ร้อนซึ่งจะกลายเป็นอิมัลชันไฟอิงแว็กซ์ (emulsifying wax) ซึ่งการเย็นตัวจะเป็นการควบคุมขนาดของอนุภาคและความหนืด นอกจากนี้ยังมีการผสมพอลิเมอร์เรซินลงไปด้วย ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษและกระดาษแข็ง (paperboard)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินและน้ำเสียบริเวณบ่อบำบัด
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดเลือก
3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แว็กซ์เอสเทอร์โดยเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจากเชื้อที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าโดยใช้ไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลาจากโรงงานแปรรูปอาหารทะเลของบริษัทสงขลาแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) โดยนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และเปรียบเทียบการสังเคราะห์แว็กซ์เอสเทอร์จากไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน โดยเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบและเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ได้สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสและสังเคราะห์แว็กซ์เอสเทอร์ได้
2. สามารถนำน้ำมันจากบ่อบำบัดซึ่งเป็น วัสดุเศษเหลือมาใช้ประโยชน์ให้เกิดมูลค่า โดยสังเคราะห์เป็นแว็กซ์เอสเทอร์
3. ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วัสดุ

1. ตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อและสกัดไขมัน

1.1 ตัวอย่างที่ใช้สำหรับการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ตัวอย่างที่นำมาแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสมีทั้งตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำโดยเก็บตัวอย่างดินรอบๆ บริเวณบ่อดักไขมัน ทั้งหมด 10 จุด จุดละ 100 กรัม และตัวอย่างน้ำเสียหรือน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียจำนวน 10 จุด คือ บ่อดักไขมันจำนวน 2 จุด คูปล่อยน้ำทิ้ง 2 จุด บ่อพักของกากตะกอน 2 จุด ถึง grease trap 2 จุด และบ่อพักน้ำเสีย 2 จุด โดยตัวอย่างทั้งหมดเป็นของโรงงานสงขลาแคนนิ่ง จำกัด (มหาชน) ในอำเภอเมืองสงขลา จังหวัดสงขลา ซึ่งเป็นโรงงานผลิตปลาบรรจุกระป๋อง

1.2 ตัวอย่างน้ำเสยรวมเพื่อนำมาวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย โดยเก็บจากท่อรวมน้ำเสียที่ไหลลงสู่บ่อดักไขมัน

1.3 ตัวอย่างก้อนไขมันในบ่อดักไขมันเพื่อนำมาสกัดไขมันที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

ทำการเก็บตัวอย่างก้อนไขมันในบ่อดักไขมันเป็นตัวอย่างจากก้อนไขมันที่ลอยตัวหนาประมาณ 1 ฟุต ในบ่อดักไขมัน ทำการเก็บจากผิวหน้าของไขมันในระดับความลึกประมาณ 10 เซนติเมตร เก็บปริมาณมากเพื่อนำมาสกัดด้วยเฮกเซน โดยทำการสกัดทันที ไขมันที่สกัดได้จะเก็บในสภาวะสุญญากาศด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน

อาหารเหลวพื้นฐาน (basal medium) (ดัดแปลงจาก Chaiyaso, 2007) ซึ่งในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย ทริปโตน 1.0 กรัม, ยีสต์สกัด 1.0 กรัม, K_2HPO_4 2.0 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม และ $CaCl_2$ 0.15 กรัม พีเอช 6.0 เติมน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลาปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ กรณีเป็นอาหารแข็งพื้นฐานจะเติมผงวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐาน

3. สารเคมี

- 4.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธี Lee และ Rhee (1993)
 - 4.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry และคณะ (1951)
- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมดเป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (Analytical grade)

อุปกรณ์

1. เครื่องซั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D
2. เครื่องซั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210 s บริษัท Sartorius
3. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 5227044 บริษัท Hotpack
4. เครื่องอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert
5. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 420A บริษัท Orion Research
7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น YS100 บริษัท Nikon
8. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi
9. โถดูดความชื้น (Desiccator)
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น 5203 บริษัท Hitachi
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ชนิดควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Universal 32R บริษัท eppendorf
12. ตู้อบ (hot air oven) รุ่น MOV 212 บริษัท Sanyo Electric
13. เครื่อง Thin-layer chromatography/Flame Ionization Detection analyzer (TLC/FID analyzer) รุ่น Iatroscan MK5 บริษัท Iatron Laboratories
14. เครื่องระเหยแห้งแบบสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น N-100 บริษัท Eyela
15. เครื่องเขย่า รุ่น 3005 บริษัท Lab-Line

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ใช้วิธี Two-phase emulsion method ดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993)

1.1. สารผสมในปฏิกิริยา

สารผสมในปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำมันปลาล์มความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ละลายในไอโซออกเทน สารละลาย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช

6.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายส่วนใสที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออกปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กรณีที่เป็นเอนไซม์ไลเปสตรังรูปและเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบใช้ปริมาณ 5 มิลลิกรัม นำไปปั่นบนเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิบัติการโดยเติมสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6.0 โมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้นที่อุณหภูมิห้อง

1.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมัน

วิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธี Cupric acetate คัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) โดยดูดสารละลายส่วนบนในปฏิบัติการจากข้อ 1.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเจือจางกับไอโซออกเทนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปทำปฏิกิริยากับ cupric acetate-pyridine reagent เข้มข้น 5 % (w/v) ในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้ได้ 6.1 โดยใช้ pyridine ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมกันอย่างรวดเร็วด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 15 วินาที โดย cupric acetate จะทำหน้าที่ฟอร์มเป็นโครงสร้างตาข่ายกับกรดไขมันอิสระทำให้สารละลายส่วนใสด้านบนเป็นสีเขียว ทิ้งให้แยกชั้นและนำส่วนไอโซออกเทนไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก (ภาคผนวก ข)

1.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ไลเปส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มให้ได้กรดไขมันอิสระในรูปกรดปาล์มิติกปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส

2. การวัดการเจริญของเชื้อ

ตรวจวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บไว้วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์เป็นแบลนด์

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ใช้วิธี Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ด้วย Thin layer chromatography/Flame Ionization Detector (TLC/FID)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันด้วย TLC/FID analyzer สำหรับขั้นตอนและสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย TLC/FID analyzer (Iatroscan MK5, Iatron Laboratories Inc., Japan) (ดัดแปลงจาก Freedman *et al.*, 1984; Rosu *et al.*, 1997 อ้างโดย Chaiyaso, 2007) นำไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันด้วยเฮกเซน 1 ไมโครลิตร ซึ่งเจือจางด้วยคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม spot สารละลายตัวอย่างลงบน Chromarod S III (Silica gel powder coated rod) นำ chromarod ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เบนซีน:คลอโรฟอร์ม:กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 50:20:0.7 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร เป็นเวลา 35 นาที หลังจากนั้นนำไปประเหตว์ทำละลายที่เหลือโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาสแกนภายใต้สภาวะที่มีอัตราการไหลของไฮโดรเจน 150 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลเข้าของอากาศ 700 มิลลิลิตรต่อนาที และมีอัตราเร็วในการสแกน 30 วินาทีต่อ rod ส่วนประกอบที่ได้จะถูกคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โมลต่อพื้นที่ได้กราฟของแต่ละองค์ประกอบ โดยที่ไตรกลีเซอไรด์, กรดไขมันอิสระ, 1,3 ไตรกลีเซอไรด์, 1,2 ไดกลีเซอไรด์ และโมโนกลีเซอไรด์ จะแยกออกมาตามเวลาดังภาคผนวก ข

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณแวกซ์เอสเทอร์ให้นำตัวอย่างสารละลายที่ทำปฏิกิริยา 1 ไมโครลิตร ที่เจือจางด้วยคลอโรฟอร์มที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม spot สารละลายตัวอย่างลงบน chromarod S III (Silica gel powder coated) นำ chromarod ไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบไปด้วย เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์:กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 65:6.5:0.4 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร) จนกระทั่งสารละลายเคลื่อนที่สูงประมาณ 10 เซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปประเหตว์ทำละลายที่เหลือโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาสแกนภายใต้สภาวะที่มีอัตราการไหลของไฮโดรเจน 150 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการไหลเข้าของอากาศ 700 มิลลิลิตรต่อนาที และมีอัตราเร็วในการสแกน 30 วินาทีต่อ rods (Isono *et al.*, 1995)

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันด้วย Gas chromatography-Mass spectrometry (GC-MS)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันด้วยเครื่อง GC-MS (HP 5890 Gas chromatograph-HP 5972 Mass Selective Detector) โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX capillary ซึ่งทำจาก polyethylene glycol ขนาดยาว 30 เมตร ความหนา 0.25 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร กำหนดให้มีสภาวะการทำงาน ดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นของ oven เท่ากับ 185 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 0.3 นาที และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 8 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งถึง 230 องศาเซลเซียส คงที่เป็นเวลา 13.30 นาที และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งถึง 240 องศาเซลเซียส และคงอุณหภูมิไว้ที่ 240 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แก๊สพา คือ แก๊สฮีเลียม องค์ประกอบที่ถูกแยกออกมาจาก column จะผ่านเข้าไปในส่วนของเครื่อง Mass spectrometry (MS) ซึ่งมีสถานะเป็นสุญญากาศ แล้วเข้าไปเจอกับ ion source ซึ่งจะทำหน้าที่ไอออไนซ์โมเลกุลที่ผ่านเข้ามาให้กลายเป็นประจุโดยใช้ลำอิเล็กตรอน (Electron Ionization (EI)) จากนั้นประจุก็จะเข้าสู่เครื่องคัดแยกและแยกแยะขนาดของประจุ (mass analyzer) และเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) เพื่อทำการตรวจหาปริมาณของประจุแล้วแปลผลออกมาเป็นปริมาณขององค์ประกอบแต่ละตัวที่มีอยู่ในสารตัวอย่าง โดยจำแนกองค์ประกอบของสารโดยเปรียบเทียบกับ National Institute of Standards and Technology (NIST) Library

6. การเตรียมน้ำมันปลาที่สกัดจากน้ำนิ่งปลาทูน่าที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการแยกเชื้อ

การเตรียมน้ำมันปลาที่สกัดจากน้ำนิ่งปลาทูน่าที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำตามวิธีของสมบัติ รุ่งศิลป์ (2541) ดังนี้

1. การกำจัดสารเหนียว โดยเติมกรดซัลฟิวริกร้อยละ 0.15 ลงในน้ำมันปลาทูน่า เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำปริมาณร้อยละ 2 เป็นเวลา 20 นาที นำไปเหวี่ยงแยกสารเหนียวด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำมันที่อยู่บนชั้นบนไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. การทำน้ำมันให้เป็นกลาง โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 11.60 (16 องศาโบเม (Degree Baume)) ในปริมาณมากเกินพอร้อยละ 0.5 ทำปฏิกิริยาสะบู่เป็นเวลา 5 นาที ปรับอุณหภูมิน้ำมันเป็น 70 องศาเซลเซียส ทันที จากนั้นปล่อยให้สบู่ตกตะกอนแยกตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานานประมาณ 10 ชั่วโมง นำน้ำมันที่ได้ไปเหวี่ยงตะกอนสบู่อีกครั้งด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำมันที่อยู่ชั้นบนไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3. การเติมต่างซ้ำ โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 28.72 (40 องศา โบรม) ปริมาตรร้อยละ 3 ทำปฏิกิริยาสบูเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำเช่นเดียวกับการทำให้เป็นกลาง แล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที นำน้ำมันที่ได้ไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำมันที่อยู่ชั้นบนไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4. การฟอกสีน้ำมัน โดยเติมดินฟอกสีชนิดแอกติเวทเตดเอิร์ทร้อยละ 5 ลงในน้ำมันที่ได้จากข้อ 3 เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ที่ความดันสูญญากาศ 27 นิ้วปรอท ปล่อยให้ น้ำมันมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยเครื่องสูญญากาศ

5. การแยกส่วนไขมัน โดยเติมตัวทำละลายเฮกเซนลงในน้ำมันที่ผ่านการกรองจากข้อ 4 ในสัดส่วนน้ำมันต่อเฮกเซน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองผลิตภัณฑ์รีนและระเหยเฮกเซนออกจากน้ำมัน (โอเลอิน) ด้วย Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จะมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (Replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) version 14.0

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียรวม และการสกัดไขมันจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน

1.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียรวม ซึ่งเก็บโดยนำขวดพลาสติกกรองน้ำเสียจากท่อ รวมน้ำเสียที่ไหลลงสู่บ่อดักไขมัน ปริมาตร 1 ลิตร และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน, ไขมัน, ความชื้น (AOAC, 1990) และเกลือโซเดียมคลอไรด์ (AOAC, 1995) (ภาคผนวก ก)

1.2 การสกัดไขมันจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน

นำตัวอย่างก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน ซึ่งเก็บจากผิวหน้าของชั้นไขมันในระดับ ความลึกประมาณ 10 เซนติเมตร มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ทำการละลาย ตัวอย่างก้อนไขมันในบ่อดักไขมันด้วยเฮกเซนในอัตราส่วน 1:2 กรองเอาสิ่งสกปรกออกด้วย กระดาษกรองและแยกเอาน้ำที่ปนอยู่กับตัวอย่างออกด้วยกรวยแยก แล้วจึงนำตัวอย่างไขมันที่สกัด

จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน ซึ่งอยู่ส่วนบนไประเหยด้วยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator และหาปริมาณของกรดไขมันอิสระ (IUPAC, 1979) วิธีการตามภาคผนวก ก.

1.3 การวิเคราะห์ห้องค้ประกอบของไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน

วิเคราะห์ห้องค้ประกอบของไขมันจากตัวอย่างไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer (Chaiyaso, 2007) ดังวิธีการวิเคราะห์ห้ในข้อที่ 4

2. ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันด้วย silica gel column chromatography

2.1 ทำการละลายไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันจากข้อ 1.2 ปริมาณ 1 กรัม ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร จากนั้นหยอดลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจลคอลัมน์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร และสูง 12.5 เซนติเมตร วิธีการเตรียมในภาคผนวก ก. ะตัวอย่างออกมาด้วยตัวทำละลาย 4 ระบบ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร คือ

ระบบที่ 1 คือ เฮกเซน:ไดเอทิลอีเทอร์:กรดอะซิติก อัตราส่วน 60:40:1

ระบบที่ 2 คือ ไดเอทิลอีเทอร์:กรดอะซิติก อัตราส่วน 40:1

ระบบที่ 3 คือ ไดเอทิลอีเทอร์:กรดอะซิติก อัตราส่วน 4:1

ระบบที่ 4 คือ เมทานอล

2.2 เก็บตัวอย่างไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันที่ออกมาของแต่ละระบบ ระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหลอดของแต่ละตัวอย่างในตู้ควั่นแห้ง ตรวจสอบสารแต่ละระบบด้วย TLC/FID analyzer ดังวิธีการวิเคราะห์ห้ในข้อที่ 4 จากนั้นนำแต่ละตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์ห้องค้ประกอบของไขมันด้วย GC-MS (Kaewsuwan *et al.*, 2006) ดังวิธีการวิเคราะห์ห้ในข้อที่ 5 ที่ศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต่อไป

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติ

3.1 ทำการเก็บตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียจากบริเวณบ่อดักไขมัน ทั้งหมด 10 จุด ทำการสุ่มเก็บจากผิวดินในระดับความลึก 0-5 เซนติเมตร โดยใช้ช้อนตักดินใส่ในถุงพลาสติกใสจุดละ 100 กรัม และตัวอย่างน้ำเสียหรือน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันจากบ่อบำบัดน้ำเสียจำนวน 10 จุด คือ บ่อดักไขมันจำนวน 2 จุด คุบล้อยน้ำทิ้ง 2 จุด บ่อบั่กของกากตะกอน 2 จุด ถึง grease trap 2 จุด และบ่อบั่กน้ำเสีย 2 จุด โดยใช้กระบวยตักน้ำเสียจุดละ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการวัดอุณหภูมิและพีเอชของตัวอย่างที่เก็บ

3.2 นำตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือตัวอย่างน้ำเสีย 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวพื้นฐานสูตรเดิมใหม่ ทำการบ่มและเขย่าในสภาวะเช่นเดียวกับข้างต้น จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวพื้นฐานสูตรเดิมใหม่อีกครั้ง และทำการบ่มและเขย่าใน สภาวะเช่นเดียวกับข้างต้น เพื่อคัดเลือกเชื้อที่สามารถใช้น้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลาเป็นแหล่งคาร์บอน และผลิตเอนไซม์ไลเปส จากนั้นนำหลอดตัวอย่างมาทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} แล้ว spread plate บนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือก โคโลนีที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยสังเกตจากวงใส รอบๆ โคโลนี แล้วนำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนี ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีน้ำมันปลา จากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ อีก 2 ครั้ง โดยทำการบ่มในสภาวะเดิม เพื่อให้แน่ใจว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ และทำการถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารแข็งพื้นฐาน ฐานวุ้นเอียงสูตรเดิม โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส และทำการ subculture ทุกๆ 1 เดือน และเก็บไว้ในกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการ subculture ทุกๆ 6 เดือน เพื่อเก็บเป็น stock culture นำ แบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้มาการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมแกรมบันทึกลักษณะและสีของโคโลนี รูปร่างของเซลล์และการย้อมแกรม

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาจากน้ำ นิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มี ไตรบิวไทรีน 1 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นน้ำมันคาร์บอน 4 อะตอม แทนน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา โดยนำ แบคทีเรียทั้งหมดที่แยกได้จากอาหารวุ้นเอียงมา spot ลงบนจานอาหาร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดขนาดของวงใสและโคโลนีเพื่อหาประสิทธิภาพการย่อยสลายตาม สมการที่ 1 จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่เกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีไตรบิวไทรีน ทั้งหมดซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อยู่ในกลุ่ม Hydrolase คือ ไลเปสหรือเอสเทอเรส มาทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสอีกครั้ง โดยเลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มี น้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ โดยนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐาน 5 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงโดยทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปหมუნเหียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 ส่วนตะกอนนำไปหาการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 2 จากนั้นทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ให้กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดมา 1 สายพันธุ์ และจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วย 16S rDNA โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่หน่วยความร่วมมือการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งมหาวิทยาลัย มหิดลและมหาวิทยาลัยไอซาก้า (MU-OU:CRC) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

$$\text{ประสิทธิภาพการย่อยสลาย} = \frac{\text{ขนาดของวงใส (ซม.)}}{\text{ขนาดของโคโลนี (ซม.)}} \quad (1)$$

(Index of hydrolysis)

5. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 4 จำนวน 1 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 1.0 ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อนำไปบ่มในสถานะเช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น เก็บตัวอย่างครั้งละ 1.0 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างชุดทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปหมუნเหียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) โดยใช้ น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 ส่วนตะกอนนำไปหาการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 2

6. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

6.1 ผลของชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาศึกษาผลของชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียใน

พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา น้ำมันปลา์ม ไตรบิวไทรีน โมลาส ซูโครส และกลูโคส โดยใช้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยมีทริปโติน 1.0 กรัม, ยีสต์สกัด 1.0 กรัม, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม, K_2HPO_4 2.0 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม, CaCl_2 0.15 กรัม ปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะเช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง นำไปหมวนเหียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) โดยใช้น้ำมันปลา์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 ส่วนตะกอนนำไปหาการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 2 เลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้การผลิตเอนไซม์สูงที่สุด มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนตามวิธีการทดลองเช่นเดียวกัน โดยใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 0, 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์

6.2 ผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจน โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 1.0 ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นในอัตราส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีที่มีแหล่งคาร์บอนและปริมาณที่เหมาะสมจากผลข้อ 6.1 ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ทริปโติน, ยีสต์สกัด, แอมโมเนียมซัลเฟต เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิมที่มีแหล่งไนโตรเจนทั้งสาม ปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยมี K_2HPO_4 2.0 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม และ CaCl_2 0.15 กรัม ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และมีชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะเช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง นำไปหมวนเหียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) โดยใช้น้ำมันปลา์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 ส่วนตะกอนนำไปหาการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 2 เลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่สามารถให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด มาศึกษาปริมาณของแหล่ง

ไนโตรเจนตามวิธีการทดลองเช่นเดียวกัน โดยใช้ปริมาณแหล่งไนโตรเจน คือ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์

7. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์บางส่วนโดยการตกตะกอนโปรตีน

ทำการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อที่ 6.2 จากนั้นนำไปหมუნเหวียงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเริ่มต้นโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ใช้วิธี Lowry และคณะ (1951) ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 3 และเก็บส่วนใสไปตกตะกอนเอนไซม์ด้วยสารต่างๆ อย่างละ 100 มิลลิลิตร โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตระดับความอิ่มตัวของเกลือ 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยการชั่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ผ่านการบดละเอียดแล้ว ค่อยๆ ใส่เกลือทีละน้อยในสารละลายส่วนใส โดยทำที่อุณหภูมิห้อง ตั้งในอ่างที่มีน้ำแข็ง เมื่อใส่เกลือจนหมด ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส ส่วนการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ 2 ชนิด คือ เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และอะซิโตน โดยต้องนำตัวทำละลายแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 1 คืน ก่อนนำมาใช้ในการตกตะกอนสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยการเติมตัวทำละลายอย่างช้าๆ ในอัตราส่วนของสารละลายส่วนใส 1 ส่วนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ส่วน ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปหมუნเหวียงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนของเอนไซม์ออกจากส่วนใส นำตะกอนและส่วนใสหลังจากตกตะกอนไปหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) ใช้ น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ใช้วิธี Lowry และคณะ (1951) ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 3 เลือกสารที่ใช้ในการตกตะกอนที่ให้กิจกรรม และผลได้ของเอนไซม์สูงที่สุดในการตกตะกอนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

8. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ

นำเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ได้จากการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนที่เหมาะสมตามข้อ 7 ไปทำแห้งเยือกแข็ง (freeze drying) แล้วนำเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบไปศึกษาคุณสมบัติและคุณลักษณะต่างๆ ดังนี้

8.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมไลเปสโดยวิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยคัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) ใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 โดยใช้บัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25, 30, 37, และ 45 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วย cupric acetate โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มติก (ภาคผนวก ข) และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยของเอนไซม์

8.2 พีเอชที่เหมาะสม

ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยคัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) ใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ คือ โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 และ 7.0 ใช้ Tris-HCl ที่พีเอช 7.0 และ 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 8.1 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วย cupric acetate โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มติก (ภาคผนวก ข) และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยของเอนไซม์

8.3 ความคงตัวของพีเอช

ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีพีเอชต่างๆ กัน คือ โซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 6.0 และ 7.0 ใช้ Tris-HCl ที่พีเอช 7.0, 8.0 และ 9.0 และ glycine-NaOH ที่มีพีเอช 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 8.1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยคัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) ใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 300 รอบ

ต่อมาที่ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 8.1 วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วย cupric acetate โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก (ภาคผนวก ข) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยของเอนไซม์และคำนวณกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปส (%) โดยให้ชุดการทดลองที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเป็นร้อยเปอร์เซ็นต์

8.4 ความคงตัวของเอนไซม์

ศึกษาความคงตัวของไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 4, 10, 25, 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 8.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) ใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท ดังในวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 1 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 8.1 วิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระด้วย cupric acetate โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติก (ภาคผนวก ข) คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยของเอนไซม์ และคำนวณกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ไลเปส (%) โดยให้ชุดการทดลองที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเป็นร้อยเปอร์เซ็นต์

9. การคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

ปฏิกิริยาที่ใช้ในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ดัดแปลงวิธีการจาก Salis และคณะ (2003) โดยจะทำปฏิกิริยาในอัตราส่วนของไขมันต่อแอลกอฮอล์ของกรดไขมันเท่ากับ 1 ต่อ 3 โมล/โมล (137.3 μmol /412.47 μmol) โดยทำการชั่งไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อบำบัดปริมาณ 0.1153 กรัม (น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 839.1189 กรัมต่อโมล (ภาคผนวก ก)) มาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง cetyl alcohol (แอลกอฮอล์ที่มีสายคาร์บอนเท่ากับ 16 อะตอม) ปริมาณ 0.1 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้า ปริมาณ 1 ยูนิต ได้แก่ Lipozyme RMIM (16.75 มิลลิกรัม), Lipozyme TLIM (1.0 มิลลิกรัม), Novozyme 435 (4.15 มิลลิกรัม), Lipase PS (1.83 มิลลิกรัม) และ Lipase AK (2.10 มิลลิกรัม) นำหลอดปฏิกิริยาไปเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยุดปฏิกิริยาด้วยคลอโรฟอร์ม อัตราส่วน 1:2 และนำไปวิเคราะห์ปริมาณแวกซ์เอส

เทอร์ด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 4 และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการวิเคราะห์ข้อที่ 7

10. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าและเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน

10.1 ระยะเวลาและปริมาณเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ ทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 9 โดยเตรียมปฏิกิริยา ดังนี้ ชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้า ทำปฏิกิริยาโดยใช้อัตราส่วนของไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันต่อแอลกอฮอล์ของกรดไขมันเท่ากับ 1 ต่อ 3 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/412.47 \mu\text{mol}$) โดยทำการชั่งไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันปริมาณ 0.1153 กรัม มาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง cetyl alcohol ปริมาตร 0.1 กรัม ส่วนชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน ทำปฏิกิริยาโดยใช้อัตราส่วน โมลของไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันกับแอลกอฮอล์ของกรดไขมันเป็น 1:2 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/274.8 \mu\text{mol}$) โดยทำการชั่งไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันปริมาณ 0.1153 กรัม มาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ชั่ง cetyl alcohol ปริมาตร 0.06 กรัม ละลายในเฮกเซน 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่อุณหภูมิห้อง เติมเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่คัดเลือกได้ ปริมาณ 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 ยูนิต นำหลอดปฏิกิริยาไปเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วนชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน เติมเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบปริมาณ 1, 5, 10, 20, 30 และ 40 ยูนิต จากนั้น ทำปฏิกิริยาเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ไมโครลิตร หยุดปฏิกิริยาด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:2 แล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 7

10.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการ

สังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 9 โดยเตรียมปฏิกิริยา ดังนี้ ชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้า ทำปฏิกิริยาโดยใช้อัตราส่วนของไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันต่อแอลกอฮอล์ของกรดไขมันเท่ากับ 1 ต่อ 3 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/412.47 \mu\text{mol}$) โดยนำไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันปริมาณ 0.1153 กรัม มาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับ cetyl alcohol ปริมาตร 0.1 กรัม ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ส่วนชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน ทำปฏิกิริยาโดยใช้อัตราส่วนโมลของไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันกับแอลกอฮอล์ของกรดไขมันเป็น 1:2 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/274.8 \mu\text{mol}$) โดยนำไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันปริมาณ 0.1153 กรัม มาละลายด้วยเฮกเซนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับ cetyl alcohol ปริมาตร 0.06 กรัม ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่อุณหภูมิห้อง เติมเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่คัดเลือกได้และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบในปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 10.1 จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ส่วนชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน ทำปฏิกิริยาเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ไมโครลิตร หยุดปฏิกิริยาด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:2 นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปวิเคราะห์ปริมาณการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 7

10.4 อัตราส่วนโมลที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน มาศึกษาอัตราส่วนโมลที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 9 โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองทำปฏิกิริยาในอัตราส่วนของไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน (น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 839.1189 กรัมต่อโมล (ภาคผนวก ก)) กับแอลกอฮอล์ของกรดไขมันเป็น 1:1 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/137.3 \mu\text{mol}$), 1:2 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/274.8 \mu\text{mol}$), 1:3 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/412.4 \mu\text{mol}$) และ 1:4 โมล/โมล ($137.3 \mu\text{mol}/549.7 \mu\text{mol}$) ละลายในเฮกเซน 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่คัดเลือกได้ และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบในปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อ 10.1 จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 10.2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ไมโครลิตร เจือ

จางด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:2 นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแก๊ซเอสเทอร์ด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 7

10.5 ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แก๊ซเอสเทอร์มาศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แก๊ซเอสเทอร์ ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 9 โดยทั้ง 2 ชุดการทดลอง ใช้อัตราส่วนโมลของไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันกับแอลกอฮอล์ของกรดไขมันที่เหมาะสมจากข้อ 10.4 โดยนำไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันปริมาณที่เหมาะสม มาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับ cetyl alcohol ปริมาณที่เหมาะสม ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร ซึ่งชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้า ใช้ตัวทำละลายดังนี้ เอทิลอะซิเตต (log P=0.68), คลอโรฟอร์ม (log P=2.0), เฮกเซน (log P=3.5), เฮปเทน (log P=4.0) และไอโซออกเทน (log P=4.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนชุดการทดลองที่ใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน ละลายในตัวทำละลายดังนี้ เอทิลอะซิเตต (log P=0.68), เมทิลเทอเชียรีบิวทิลอีเทอร์ (MTBE) (log P= 1.40), คลอโรฟอร์ม (log P=2.0), เฮกเซน (log P=3.5), เฮปเทน (log P=4.0) และไอโซออกเทน (log P=4.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่คัดเลือกได้ และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบในปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อ 10.1 จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 10.2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ไมโครลิตร เจ็จจางด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:2 นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแก๊ซเอสเทอร์ด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 7

10.6 ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

นำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แก๊ซเอสเทอร์และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผ่านการตกตะกอน มาศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แก๊ซเอสเทอร์ ทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 9 โดยทั้ง 2 ชุดการทดลอง ใช้อัตราส่วนโมลของไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันกับแอลกอฮอล์ของกรดไขมันที่เหมาะสมจากข้อ 10.4 โดยนำไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันและ cetyl alcohol ในปริมาณที่เหมาะสม มาวางในกล่องที่มีสารละลายเกลืออยู่ในแก้วปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยทำการบ่มกับสารละลายเกลือ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อปรับปริมาณน้ำของตัวอย่าง ควบคุมปริมาณน้ำโดยใช้สารละลายเกลืออิ่มตัว ดังนี้ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (0.33), $CuCl_2$ (0.67), $(NH_4)_2 SO_4$ (0.79) และ $BaCl_2$ (0.90) หลังจากนั้น

นำมาละลายด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมจากข้อ 10.6 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร และเติมเอ็นไซม์ไลเปสตรงรูปทางการค้าที่คัดเลือกได้และเอ็นไซม์ไลเปสอย่างหยابในปริมาณที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อ 10.1 จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 10.2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วยคลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:2 นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแวกซ์เอสเทอร์ด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 4 และวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 7

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างดินรอบๆ บริเวณบ่อดักไขมัน ทั้งหมด 10 จุด และตัวอย่างน้ำเสีย หรือน้ำทิ้งจากกระบวนการบำบัดน้ำเสียจำนวน 10 จุด เพื่อนำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าอุณหภูมิเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ระหว่าง 29-30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการผลิตปลากระป๋องน้ำทิ้งส่วนใหญ่มาจากการละลายปลารวมกับน้ำที่ใช้ทำความสะอาดเครื่องมือและล้างห้องเย็นที่ใช้เก็บรักษาวัตถุดิบ และมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.14-7.43 และตัวอย่างส่วนใหญ่มีพีเอชเฉลี่ยที่ 6.0 ดังแสดงใน Table 7 (ภาคผนวก ข)

2. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียรวม และการสกัดไขมันจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสียรวม

จากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียรวม โดยเก็บจากท่อรวมน้ำเสียที่ไหลลงสู่บ่อดักไขมัน ซึ่งมีการปนเปื้อนของไขมันและน้ำมันจากกระบวนการผลิตปลากระป๋อง โดยทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำเสียทางเคมี ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ ได้แก่ ปริมาณ โปรตีน, ไขมัน, ความชื้น, เกลือ ผลดังแสดงใน Table 3

Table 3. Chemical characteristics of wastewater from tuna canning plant.

Chemical characteristics	Values of analyses*
pH	6.87 ± 0.12
Temperature (°C)	29±1.00
Moisture (%)	99.74 ± 0.19
Salt (%)	9.17 ± 0.01
Total nitrogen (mg/l)	300 ± 0.00
Oil (mg/l)	72.97± 0.21

* Average from triplicates.

จากผล Table 3 พบว่าน้ำเสียรวมที่ได้มีค่าพีเอช 6.87 ± 0.12 อุณหภูมิ 29 ± 1.00 องศาเซลเซียส ค่าความชื้น 99.74 ± 0.19 % ปริมาณเกลือ 9.17 ± 0.01 % ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 300 มิลลิกรัมต่อลิตรและน้ำมัน 72.97 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งอุณหภูมิอยู่ในช่วงของค่ามาตรฐานน้ำทิ้งอุตสาหกรรมโดยกำหนดค่าไม่ให้เกิน 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นโรงงานผลิตปลากระป๋อง จะใช้น้ำปริมาณมากที่สุดในการบวนการละลายปลา ล้างปลา คัดไส้ผ่าท้อง โดยน้ำที่ใช้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องรวมกับน้ำเย็นจากห้องเย็นทำให้มีอุณหภูมิลดลง ส่วนค่าพีเอชของน้ำเสียมีค่าเป็นกรดอ่อนก่อนข้างเป็นกลาง ซึ่งมีปริมาณโปรตีน และปริมาณไขมันน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับคุณลักษณะของน้ำเสียรวมโรงงานผลิตปลากระป๋อง จากการศึกษาของบุญชัย วิจิตรเสถียร (2537) ที่พบว่าน้ำเสียรวมมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.19-6.63 มีปริมาณน้ำมันและไขมัน 2,300-8,500 mg/l และปริมาณโปรตีน 7,332-7,448 mg/l แต่จากงานวิจัยนี้กระบวนการผลิตปลากระป๋องของโรงงานสงขลาแคนนิ่งจะมีการแยกน้ำนึ่งปลาบางสายพันธุ์ออกจากน้ำเสียรวม ซึ่งน้ำนึ่งปลาที่ถูกแยกออกจะมีไขมันปริมาณมากลอยอยู่บริเวณผิวหน้า โดยน้ำนึ่งปลาบางสายพันธุ์จะถูกส่งไปทำเป็นน้ำปลาเข้มข้น เมื่อถูกกักเก็บออกไป ซึ่งทำให้น้ำทิ้งของโรงงานมีปริมาณโปรตีนและไขมันในปริมาณที่ต่ำ ส่วนน้ำนึ่งปลาสายพันธุ์อื่นที่ไม่นำไปทำน้ำปลาเข้มข้นจะถูกปล่อยรวมกับน้ำเสียรวม ซึ่งเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเวลา 10.00-11.00 น. อาจจะเป็นเวลาที่ไม่ได้อยู่ในช่วงของการปล่อยน้ำนึ่งปลาหรือยังมีการผลิตที่ต่ำ จึงทำให้น้ำทิ้งมีปริมาณไขมันและโปรตีนน้อย ซึ่งลักษณะของน้ำทิ้งที่ได้จะมีสีน้ำตาลอ่อน กลิ่นคาว มีเศษเนื้อปลาเล็กน้อย มีความเข้มข้นน้อยกว่าน้ำนึ่งปลา และมีไขมันลอยเป็นชั้นบาง ๆ

2.2 การสกัดไขมันจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน

เมื่อทำการสกัดตัวอย่างไขมันจากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันจำนวน 35 กิโลกรัม ด้วยเฮกเซน ในอัตราส่วน 1:2 แล้วเขย่าเป็นเวลา 30 นาที กรองเอาตะกอน และสิ่งสกปรกออกด้วยผ้าขาวบาง พบว่าไขมันละลายอยู่ในตัวทำละลายเฮกเซนซึ่งมีสีดำ เมื่อนำชั้นไขมันไประเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออกด้วยเครื่อง Rotary Evaporator อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณไขมัน 4.5 ลิตร ทั้งนี้เฮกเซนที่ระเหยออกมาจะถูกนำไปใช้ในการสกัดต่อได้อีก โดยใช้เฮกเซนในการสกัดทั้งหมด 70 ลิตร ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมันในข้างต้นมีสีน้ำตาลเข้ม แข็งตัวทันทีที่อุณหภูมิห้องและหลอมเหลวเป็นของเหลวสีดำที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และมีปริมาณกรดไขมันอิสระประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการที่ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อดักไขมัน แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องอาจเกิดจากการมีกรดไขมันอิ่มตัวสูง

2.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อคักไขมัน

- การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อคักไขมันด้วย TLC/FID analyzer

นำตัวอย่างไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อคักไขมัน ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยเครื่อง TLC/FID analyzer โดยใช้ตัวอย่างไขมันเจือจางด้วยคลอโรฟอร์ม พบว่าผลโครมาโตแกรมเปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำมันปลาบริสุทธิ์ที่ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งมี retention time ในช่วงเวลา 0.108 นาที (Figure 6A) โดยองค์ประกอบส่วนใหญ่ของตัวอย่างไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อคักไขมันด้วยเฮกเซน คือ กรดไขมันอิสระ ซึ่งมีปริมาณมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Figure 6B) มี retention time ในช่วงเวลา 0.125-0.150 นาที เป็นพีคแรก ส่วนพีคสุดท้ายจะมี retention time ในช่วงเวลา 0.445-0.457 นาที โดยจะเป็นพวกที่มีไขมันมาก เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ช้ากว่า เพื่อให้แน่ชัดจึงทำการผสมตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้กับน้ำมันปลาบริสุทธิ์ ผลจาก Figure 6C พบว่าตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้ด้วย เฮกเซนนั้นไม่ใช่เป็นไตรกลีเซอไรด์ เนื่องจาก retention time แตกต่างกัน ส่วนปริมาณกรดไขมันอิสระในตัวอย่างไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อคักไขมัน สอดคล้องกับการหาปริมาณของกรดไขมันอิสระด้วยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ (IUPAC, 1979) ตามภาคผนวก ก. พบว่ามีปริมาณกรดไขมันอิสระประมาณกว่า 90 เปอร์เซ็นต์

2.4 การทำบริสุทธิ์ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อคักไขมันบางส่วนด้วย silica gel column chromatography

การแยกไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อคักไขมันด้วยเฮกเซนมีความไม่บริสุทธิ์สูงจึงไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS และทำบริสุทธิ์ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อคักไขมันขั้นต้นโดยใช้ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี ตรวจสอบองค์ประกอบของสารด้วย TLC/FID analyzer ตามวิธีการทดลองข้อที่ 2 ผลแสดงดัง Figure 7 พบว่าไขมันที่สกัดจากก้อนไขมันในบ่อคักไขมันถูกชะออกมาตามระบบของตัวทำละลายได้ 4 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1 สารที่ได้แห้งตัวเป็นผลึกสีขาวขุ่น มีปริมาณมากกว่าตัวอย่างอื่น ส่วนตัวอย่างที่ 2 สารที่ได้เป็นของเหลวมีสีเหลืองอ่อน ส่วนตัวอย่างที่ 3 และ 4 สารที่ได้เป็นของเหลวมีสีน้ำตาลเข้ม และเมื่อนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย TLC/FID analyzer พบว่าตัวอย่างที่ 1 เป็นกรดไขมันอิสระ (Figure 6A) โดยตัวอย่างที่ 2, 3 และ 4 (Figure 7B, 7C และ 7D) โครมาโตแกรมออกมาใกล้เคียงกันในช่วงเวลา 0.430-0.450 นาที และนำตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย GC-MS โดยใช้สถานะของ Kaewsuwan และคณะ (2006) ดังในวิธีการวิเคราะห์ในข้อที่ 5

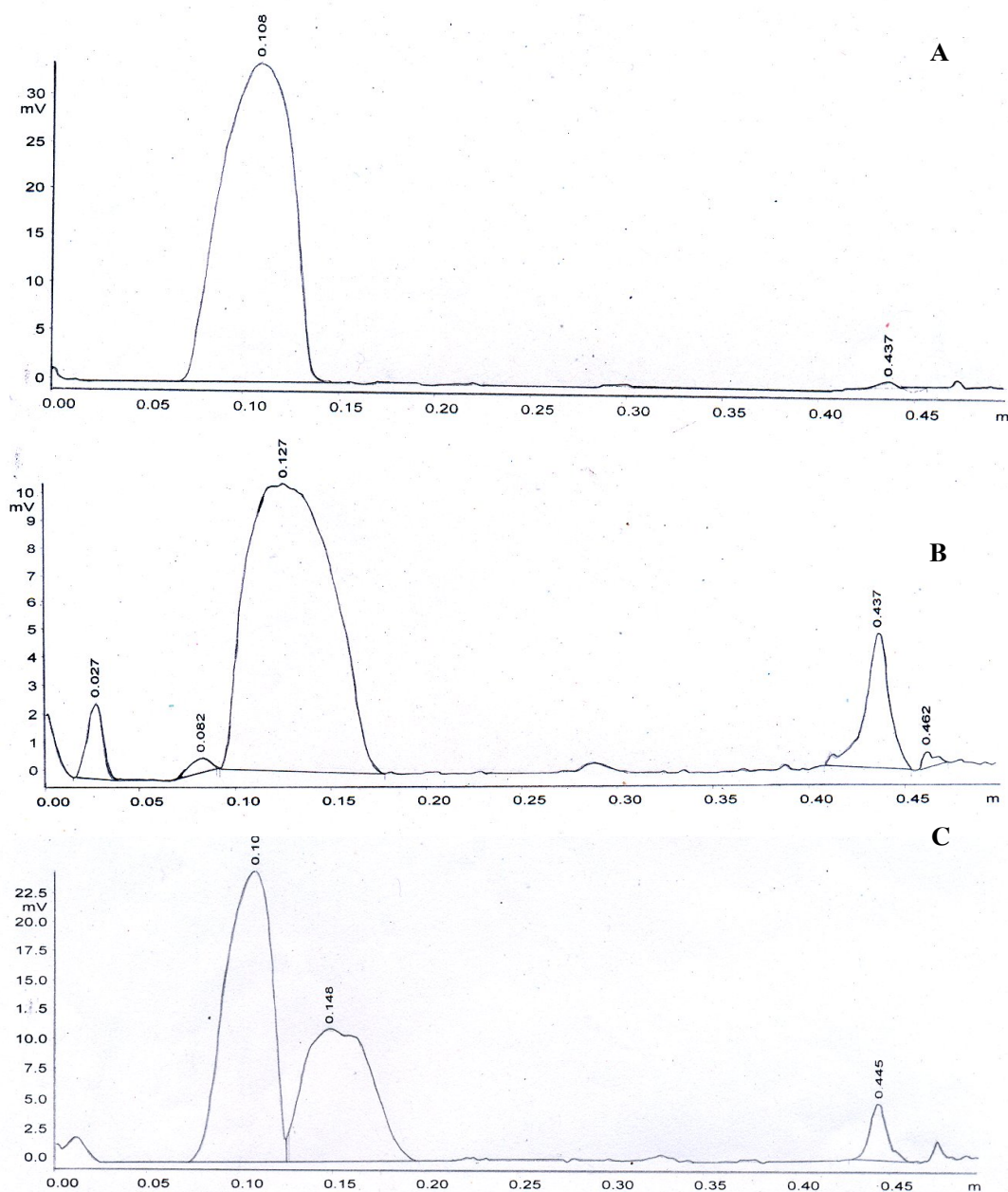


Figure 6. Composition of fatty acid from purified fish oil (A), fat extracted from fat cake (B) and mixture of purified fish oil and fat extracted from fat cake (C) by TLC/FID analyzer.

condition: Stationary phase : CHROMAROD-S III

Mobile phase : Benzene/chloroform/acetic acid (50:20:0.7) for 35 min

Gas flow : H₂ 150 ml/min, air 700 ml/min

Scanning speed : 30 sec/Rods

2.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อตกไขมันที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วย GC-MS analyzer

นำตัวอย่างไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อตกไขมันที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโตกราฟี 4 ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วยเครื่อง GC-MS โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกไขมัน (Kaewsuwan *et al.*, 2006) ดังวิธีการวิเคราะห์ในข้อที่ 5 พบว่าผลแสดงใน Table 4 สามารถสรุปได้ว่าไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันในบ่อตกไขมันด้วยเฮกเซนนั้นมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนอะตอมตั้งแต่คาร์บอน 14 ถึง 18 คือ กรดไมริสติก 4.03 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มิติก 47.39 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก 10 เปอร์เซ็นต์ กรดโอลิอิก 24.30 เปอร์เซ็นต์ และกรดลิโนเลอิก 9.5 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้การที่ตัวอย่างไขมันที่สกัดได้เกิดการแข็งตัวทันทีที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากตัวอย่างเป็นก้อนไขมันซึ่งมีการแข็งตัวอยู่แล้วและไขมันที่แข็งตัวส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว การศึกษาของ Sarabok (2000); Wongsakul และคณะ (2004) รายงานว่ากรดไขมันในน้ำมันปลาพุน่าประกอบด้วยกรดไมริสติก 4 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มิติก 20.78 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มิโตโอลิอิก 5.76 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก 6.85 เปอร์เซ็นต์ กรดโอลิอิก 10.73 เปอร์เซ็นต์ กรดลิโนเลอิก 1.68 เปอร์เซ็นต์ กรดอะราชิโคนิก 1.84 เปอร์เซ็นต์ EPA 6.42 เปอร์เซ็นต์ และ DHA 28.18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งหมดเป็นกรดไขมันสายยาวตั้งแต่คาร์บอน 14-22 อะตอม และ Rachapol (2007) ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันปลาพุน่าที่ทำบริสุทธิ์ พบว่ามีกรดไมริสติก 6.02 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มิติก 26.78 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มิโตโอลิอิก 5.82 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก 5.85 เปอร์เซ็นต์ กรดโอลิอิก 9.73 เปอร์เซ็นต์ กรดลิโนเลอิก 1.22 เปอร์เซ็นต์ กรดอะราชิโคนิก 1.84 เปอร์เซ็นต์ EPA 5.42 เปอร์เซ็นต์ และ DHA 27.18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการทดลองนี้ไขมันที่สกัดได้มาจากไขมันที่ลอยอยู่บนผิวน้ำทิ้งของบ่อบำบัดน้ำเสียเป็นระยะเวลาานกว่า 1 ปี กรดไขมันในน้ำมันจึงอาจจะถูกออกซิไดซ์ด้วยแสงและอากาศ อีกทั้งในกระบวนการผลิตปลาพุน่าในน้ำมันยังมีการใช้น้ำมันถั่วเหลืองบริสุทธิ์ แต่มีการสูญเสียไขมันในส่วนนี้น้อยมาก เนื่องจากเป็นขั้นตอนการเติมน้ำมันด้วยหัวฉีดแล้วบรรจุกระป๋องทันที จึงอาจเกิดการสูญเสียจากการกระเด็นมายังสายพานการผลิตแล้วมีการล้างออกไป ดังนั้นไขมันที่สกัดได้และผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนนั้นจึงประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวและส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันอิ่มตัว อาทิเช่น กรดปาล์มิติก ซึ่งมีคุณสมบัติของกรดไขมันอิ่มตัวนั้นสามารถแข็งตัวได้ที่อุณหภูมิห้อง มีจุดหลอมเหลวสูง โดยไขมันที่สกัดได้นั้นเริ่มเป็นของเหลวที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส มีสีค้ำน้ำตาล และกรดปาล์มิติกมีมากที่สุดประมาณ 47.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีจุดหลอมเหลวที่ 61-64 องศาเซลเซียส (Sari and Karaipekli, 2008)

จากการหาค่าประกอบของไขมันด้วยเครื่อง GC-MS จะบอกชนิดและปริมาณของกรดไขมันได้ และคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไขมันปลาได้ 839.12 กรัมต่อโมล (ภาคผนวก ก) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของไขมันที่สกัดได้ มีแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเศษเหลือให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น

Table 4. GC-MS analysis of fatty acid in partially purified fat extracted from fat cake from grease trap pond.

Sample	Retention time (min)	Identified compound	Ratio (%)
Fraction 1	3.114	Myristic acid	4.035
	4.336	Palmitic acid	47.393
	4.516	Palmitoleic acid	3.258
	5.819	Stearic acid	10.092
	6.049	Oleic acid	24.298
	6.440	Linoleic acid	9.552
	7.963	9,11-octadecadienoic acid	1.372
Fraction 2	-	Not identify	-
Fraction 3	-	Not identify	-
Fraction 4	-	Not identify	-

3. การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้อาหารแข็งพื้นฐานที่ประกอบด้วยน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา 1 เปอร์เซ็นต์ และ rhodamine B 0.001 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารดังกล่าวได้ทั้งหมด 111 ไอโซเลท แต่เรืองแสงยูวีเป็นสีม่วงได้ 80 ไอโซเลท โดยไม่พบวงใสรอบโคโลนี ซึ่งไอออนของ rhodamine B จะไปจับกับไอออนของกรดไขมันอิสระเกิดเป็น complex สามารถเรืองแสงยูวีได้ แสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสมาย่อยน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลา

การหาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันไตรบิวไทรินบนอาหารแข็ง โดยนำแบคทีเรียทั้ง 80 ไอโซเลท มา spot ลงบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีน้ำมันไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วสังเกตการเกิดวงใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้างเอนไซม์ไลเปสออกมาภายนอกเซลล์ แล้วขอย่น้ำมันซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนให้เป็นกรดไขมันอิสระ ทำให้สามารถสังเกตวงใสได้ง่าย เนื่องจากน้ำมันไตรบิวไทรินเป็นน้ำมันที่มีคาร์บอนสายสั้นเท่ากับ 4 อะตอม ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสสามารถขอย่น้ำมันได้ทั้งสายสั้นและสายยาว (Ertugrul *et al.*, 2007) จากนั้นทำการวัดขนาดวงใสรอบโคโลนีและขนาดของโคโลนีเพื่อทำการหาประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันบนอาหารแข็ง (สมการในวิธีการทดลองข้อที่ 4) ดัง Figure 8 และทำการคัดเลือกไอโซเลทที่เกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหารดังกล่าวได้ทั้งหมดจำนวน 43 ไอโซเลท โดยถือว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และคำนวณประสิทธิภาพการย่อยสลายตามสมการดังที่กล่าวข้างต้น (Figure 9) พบว่าแบคทีเรีย 43 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไตรบิวไทรินได้แตกต่างกันโดยแบคทีเรียที่เกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งพื้นฐานที่มีไตรบิวไทรินทั้งหมด คาดว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อยู่ในกลุ่ม Hydrolase คือ ไลเปสหรือเอสเทอเรส โดยไอโซเลท GT3 (19) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงที่สุด เท่ากับ 3.83 รองลงมา คือ DG4 (18) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.04 ส่วนไอโซเลท DG4 (16) และ P2R6 (2) มีค่าเท่ากับ 2.83 ส่วน GT3 (9), P2R6 (13), P2S1, P4I5 และ P4I5(6) มีประสิทธิภาพการย่อยสลายต่ำที่สุด คือ น้อยกว่า 0.5 ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งและแท่งสั้น สามารถสร้างสปอร์ได้

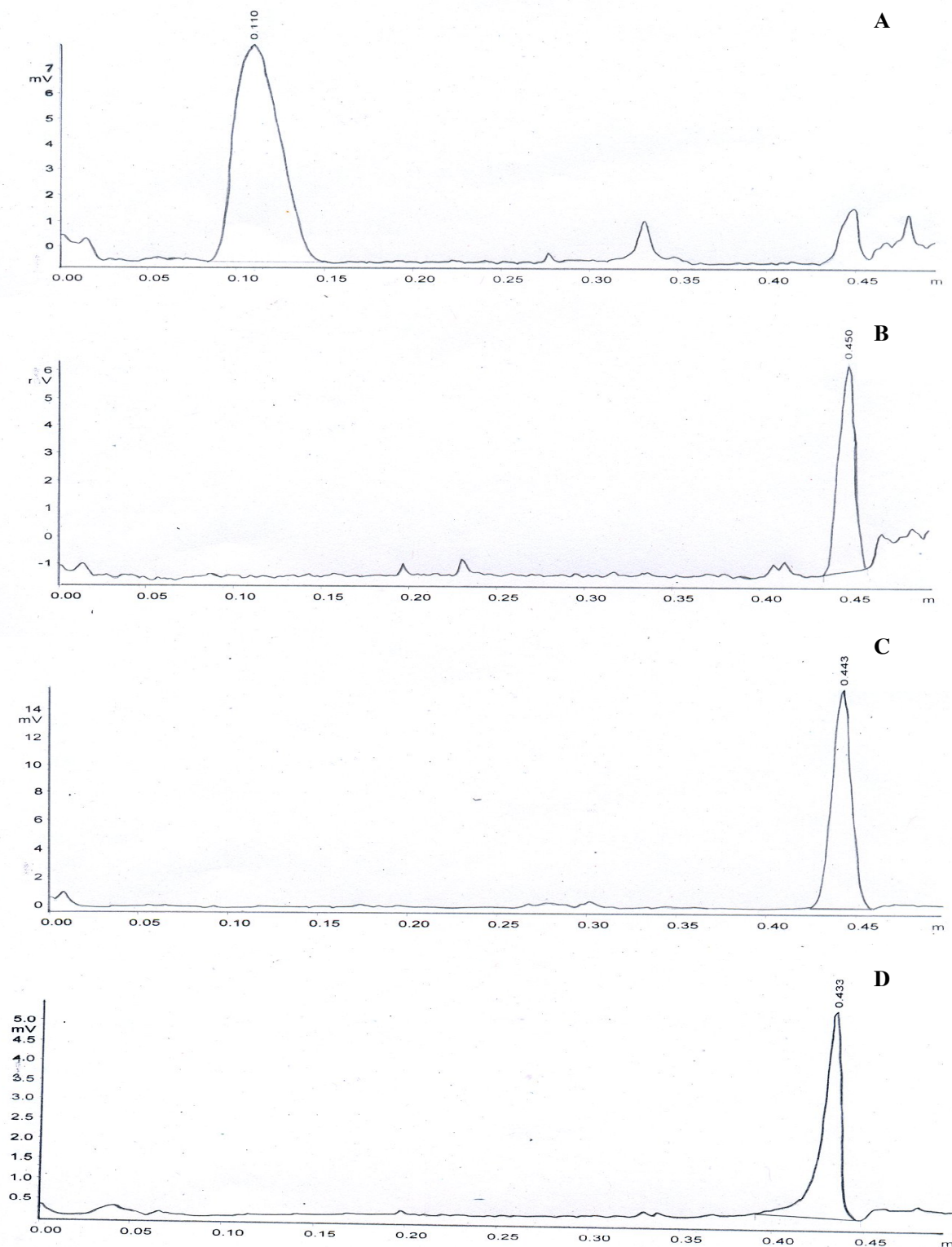


Figure 7. Composition of fatty acid from partial purified fat extracted from fat cake 4 fractions; fraction 1(A), fraction 2(B), fraction 3(C) and fraction 4(D).

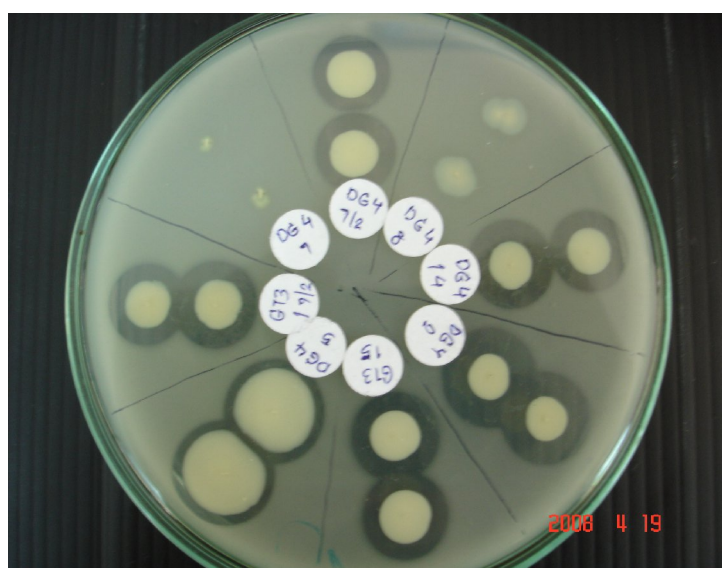


Figure 8. Tributyrin hydrolysis of bacterial isolates grown on basal medium containing 1% tributyrin at 37°C for 48 h.

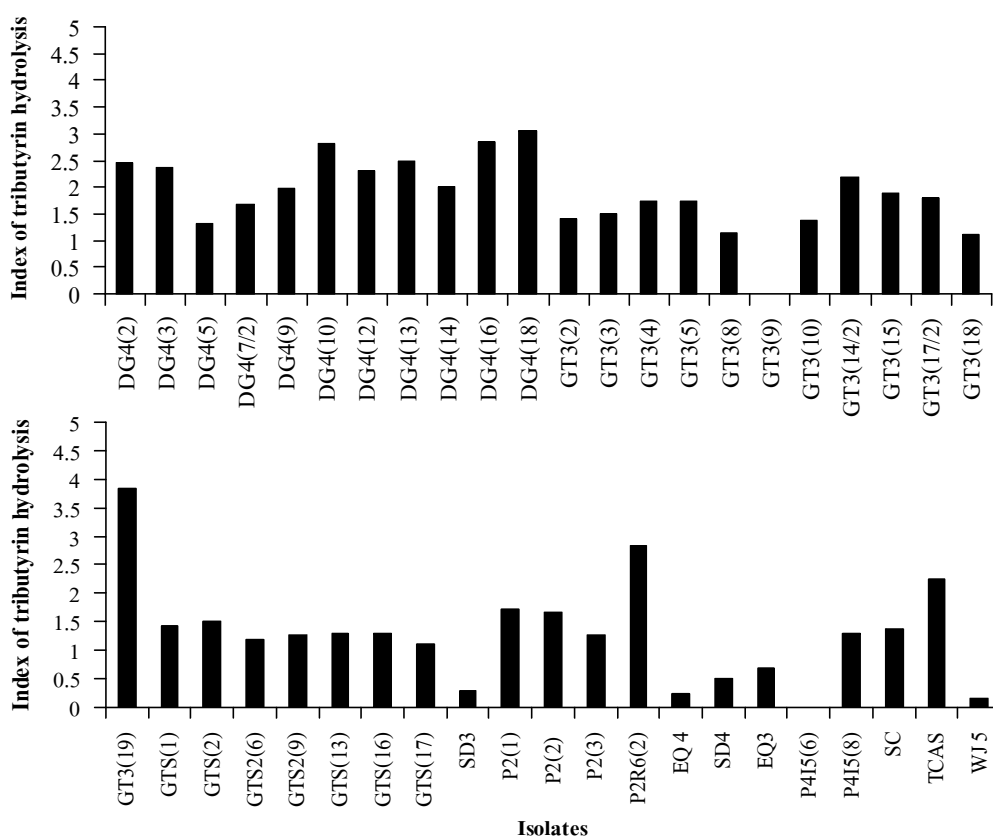


Figure 9. Hydrolysis index of the 43 bacterial isolates grown in basal medium containing 1% tributyrin at 37°C for 48 h.

4. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 43 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดกิจกรรมการย่อยสลายด้วยวิธี two-phase emulsion method ดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสับสเตรท เนื่องจากการใช้น้ำมันปลาบริสุทธิ์เป็นสับสเตรทนั้นไม่สามารถทำปฏิกิริยากับสาร cupric acetate เพราะจะเกิดตะกอนสีน้ำเงิน-ดำ และส่วนใสจะขุ่นกลายเป็นสีเหลือง จึงใช้น้ำมันปาล์มเป็นตัวแทนของสับสเตรทที่มีกรดไขมันสายยาวในการหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสแทน ซึ่งไอโซเลทส่วนใหญ่ที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายบนไตริวไทรีน (C4) สูงแต่มีกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้น้อย ทั้งนี้จะเป็นคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อความยาวของสายคาร์บอนของสับสเตรท พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท ที่มีค่ากิจกรรมในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มอยู่ในกลุ่มสูงสุด โดยไอโซเลท EQ3 มีค่ากิจกรรมสูงสุด คือ 1.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ SD 3 มีกิจกรรมรองลงมา คือ 0.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งทั้งสองไอโซเลทมีประสิทธิภาพการย่อยสลายไตริวไทรีนเพียง 0.5 และ 0.3 ตามลำดับ (Figure 10)

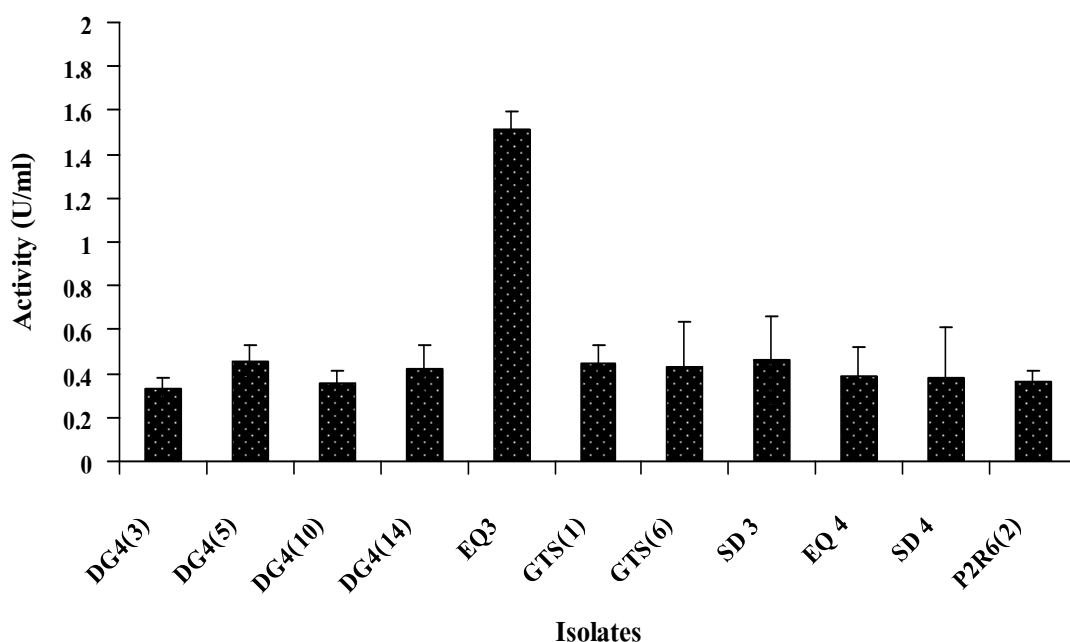


Figure 10. Lipase activity of 11 bacterial isolates (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0, 37°C and 300 rpm for 30 min).

5. การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสย่อยน้ำมันปลาได้ดีจากผลการทดลองข้อ 4 พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท EQ3 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมสูงที่สุด จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสังเกตลักษณะของสี ผิวหน้า และขอบของโคโลนีบนอาหารแข็ง nutrient agar หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสังเกตรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ทึบแสง มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่งขนาดสั้น ย้อมแกรมติดสีแดงซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ขนาดเล็กมาก ไม่มีสปอร์ ทดสอบแคตาเลสให้ผลบวก จากนั้นจึงส่งเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท EQ3 วิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA โดยส่งวิเคราะห์ผลที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท EQ3 มีความเหมือนกับแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. (identities) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ที่ 1408 คู่เบส (ภาคผนวก ง) (ดัง Figure 11) จึงให้ชื่อแบคทีเรียที่ได้ว่า *Burkholderia* sp. EQ3

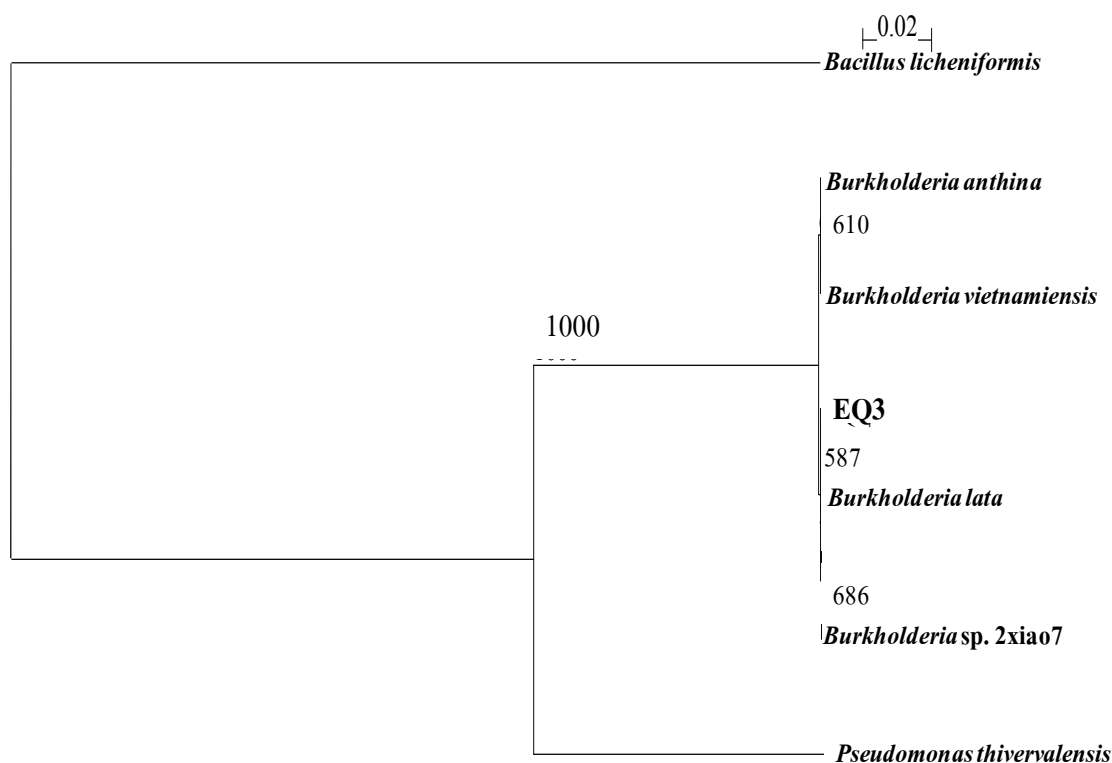


Figure 11. Phylogenetic tree of *Burkholderia* sp. EQ3.

6. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมโดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ *Burkholderia* sp. EQ3 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลา 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถเจริญได้สูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยมีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้ 5.5 หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อลดลง และเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตได้ 1.9 หน่วยต่อมิลลิลิตร แสดงว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 เกิดในช่วง log phase (Figure 12) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Mahler และคณะ (2000) พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดของแบคทีเรีย *A. calcoaceticus* คือ 12 ชั่วโมง และการทดลองของ Sharma และคณะ (2002) พบว่าการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RSJ1 สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ส่วน Gupta และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมักในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ไลเปสจาก *B. multivorans* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดที่ 15 ชั่วโมง มีกิจกรรม 58 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน Dharmsthiti และคณะ (1998) ศึกษาการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* LP602 ไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ได้ 3.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 50 ชั่วโมง การศึกษาของ Schmidt-Dannert และคณะ (1997) พบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *B. thermocatenuatus* ที่เหมาะสมอยู่ที่ 16 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.30-0.45 หน่วยต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Chaiyaso (2007) พบว่า *B. multivorans* PSU AH-130 ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 38 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่เวลา 72 ชั่วโมง จากการทดลองได้น่าระยะเวลาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 ที่เวลา 12 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการทดลองปัจจัยอื่นต่อไป

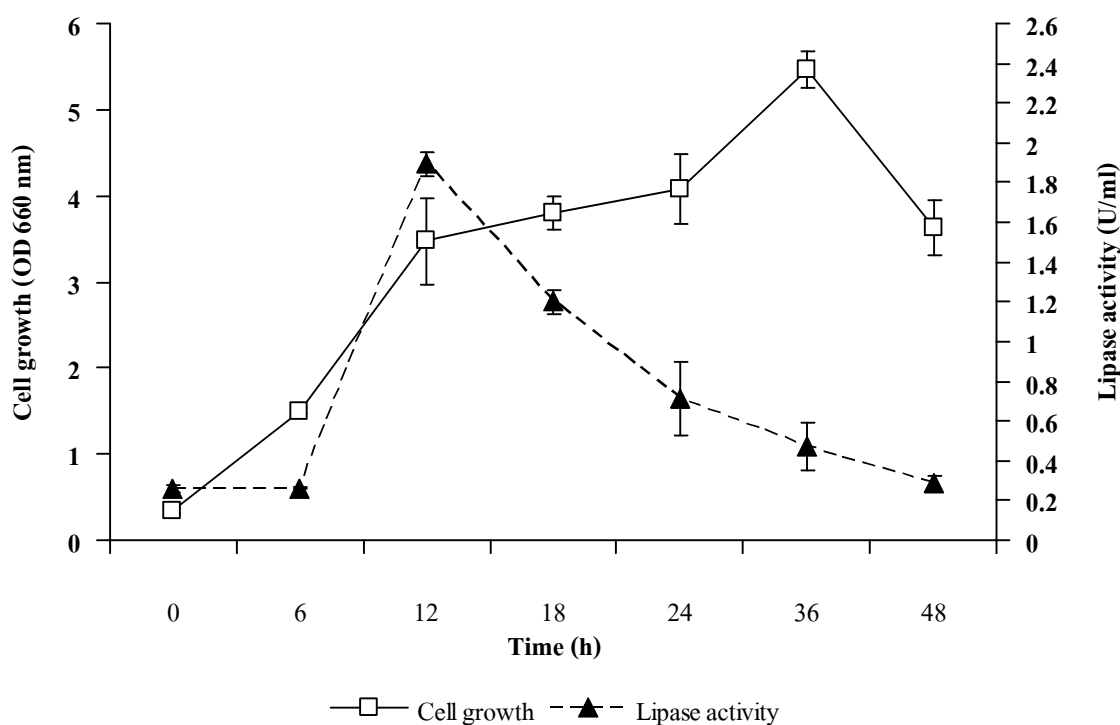


Figure 12. Growth and lipase production of *Burkholderia* sp. EQ3 cultivated in basal medium containing 1% extracted fish oil from pre-cooking condensate at 37°C with shaking speed of 200 rpm.

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

7.1 การศึกษาแหล่งและปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการเจริญ การผลิตพลังงาน ทำให้มีการผลิตเอนไซม์เพื่อนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ภายในเซลล์ จากการเลี้ยง *Burkholderia* sp. EQ3 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มี กลูโคส ซูโครส ไตรบิวไทรีน น้ำมันปาล์ม และน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 เจริญได้ดีในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ น้ำมันปาล์ม และไตรบิวไทรีน เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ (Figure 13) โดยเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อได้ 7.14 และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด 1.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ อาหารเหลวพื้นฐานที่มี

น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน มีการเจริญดีวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 6.9 และผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนอาหารเหลวพื้นฐานที่มีไตรบิวไทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 0.29 หน่วยต่อมิลลิลิตร *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันประกอบด้วยคาร์บอนสายยาว ส่วนอาหารที่มีกลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น *Burkholderia* sp. EQ3 เจริญได้น้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากค่าพีเอชของอาหารลดลง มีค่าในช่วง 2.9-3.6 ทำให้ความเป็นกรดไปยับยั้งการเจริญของเชื้อและส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสน้อยลงจากการทดลองบ่งชี้ว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้โดยต้องอาศัยตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ในที่นี้คือ น้ำมัน และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมสูงที่สุดเมื่อนำน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ ซึ่งผลการทดลองคล้ายกับ Bora และ Kalita (2007) ที่ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus* sp. LBN 4 โดยมี กลูโคส ซูโครส มอลโตส ฟรุคโตส แลคโตส และน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกโดยผลิตเอนไซม์ได้ 6.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร คล้ายกับการศึกษาของ Chaiyaso (2007) พบว่าใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. multivorans* PSU 130 ได้ 30.15 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้ำมันมะกอกส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดโอลิก ส่วน Kumar และคณะ (2005) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *B. coagulans* BTS-3 พบว่าน้ำมันมัสตาร์ดบริสุทธิ์สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.46 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Tween 80 และน้ำมันมะกอกได้กิจกรรมเป็น 0.38 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วน Rathi และคณะ (2000); Bradoo และคณะ (2002) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Burkholderia* sp. มีกิจกรรมการย่อยสลายคาร์บอนสายยาวมากกว่า 12 อะตอม

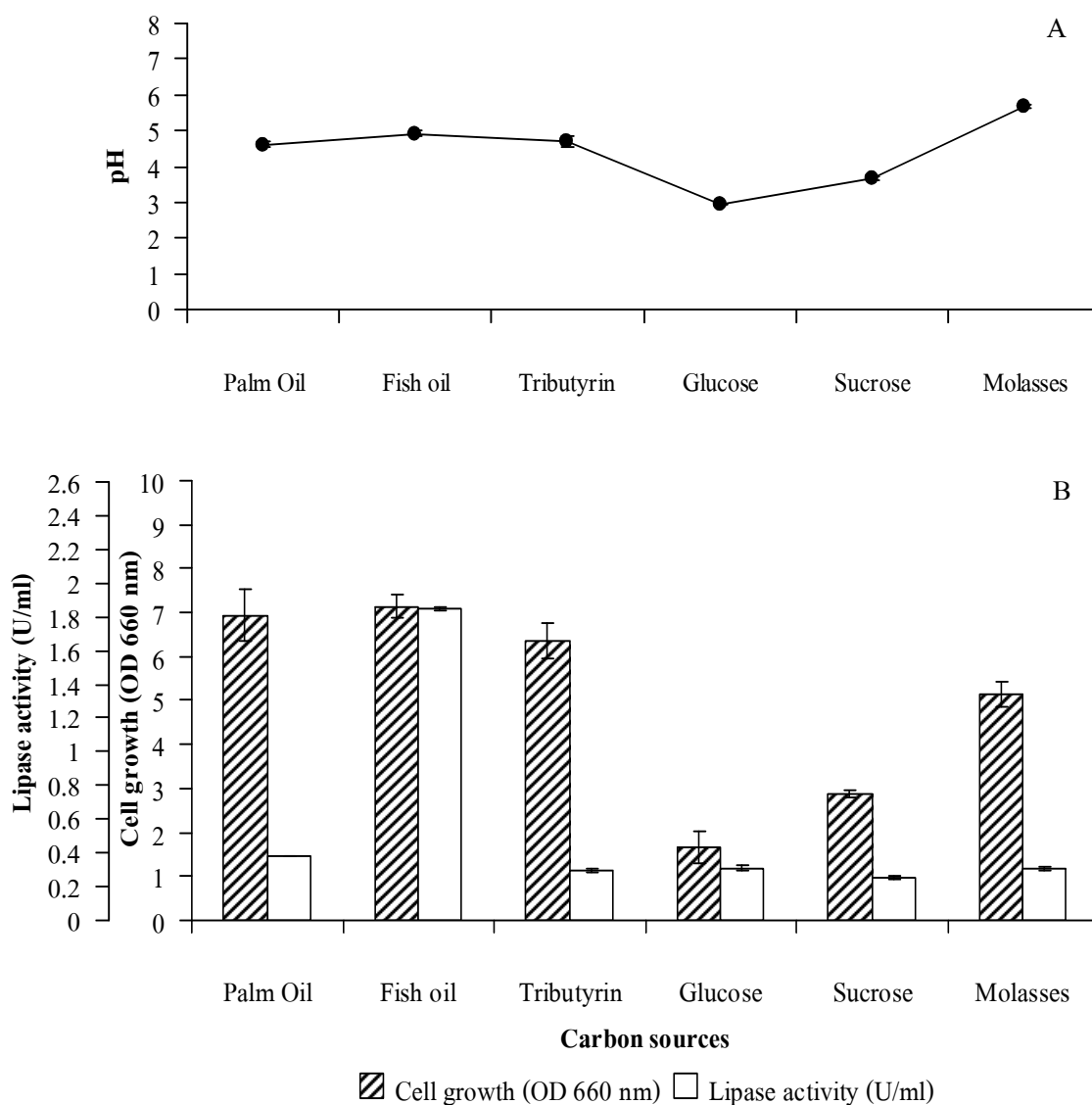


Figure 13. Effect of various carbon sources 1% (w/v) on pH (A), growth and lipase activity (B) of *Burkholderia* sp. EQ3 grown in basal medium containing 1% carbon source (palm oil, extracted fish oil from pre-cooking condensate, tributyrin, glucose, sucrose and molasses) at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h.

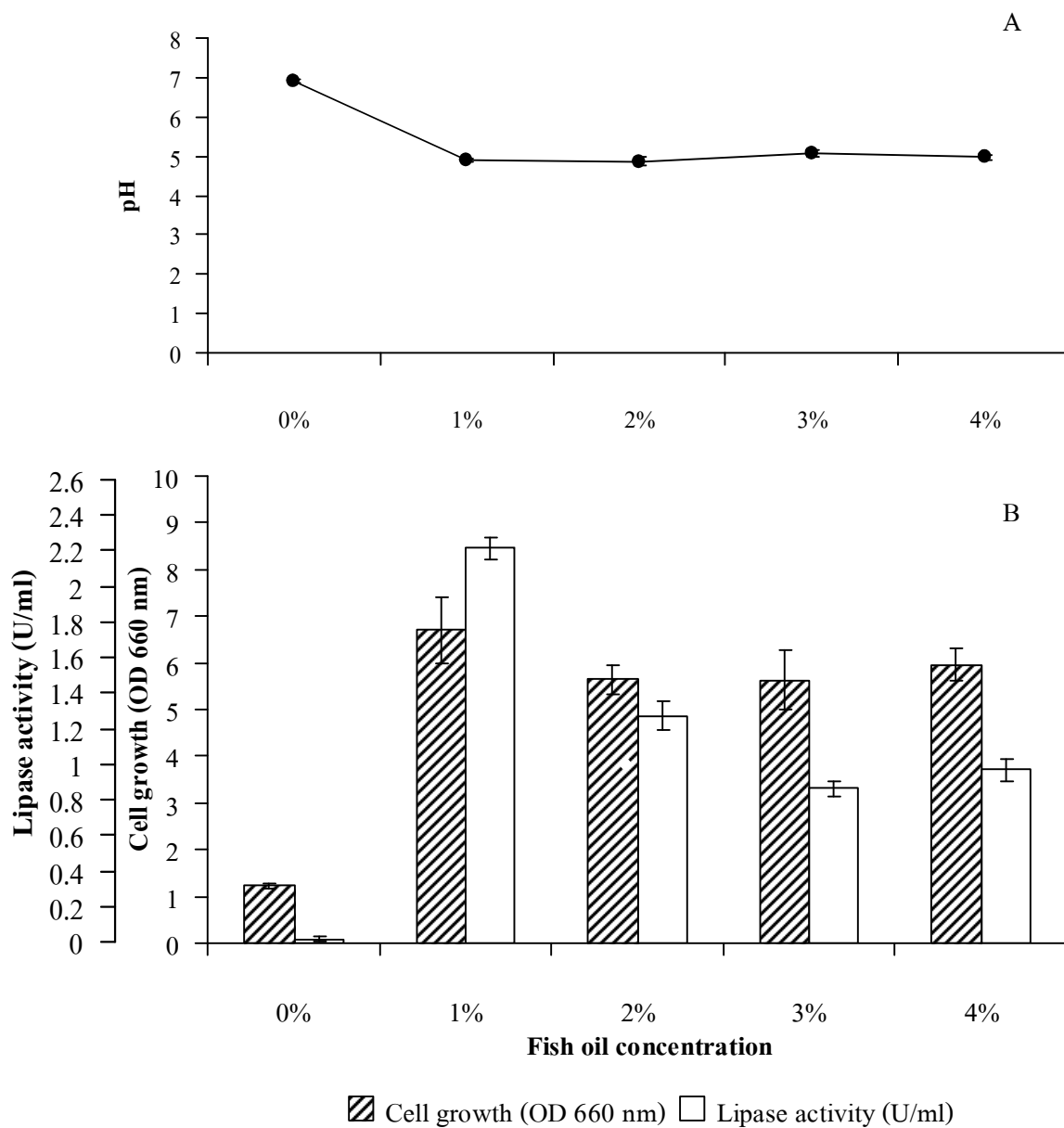


Figure 14. Effect of extracted fish oil from pre-cooking condensate concentration on pH (A), growth and lipase activity (B) of *Burkholderia* sp. EQ3 grown in basal medium at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h.

จากการทดลองผลของชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia* sp. EQ3 นั้น น้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปส ผลการทดลองดัง Figure 14 พบว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในอาหารที่มีน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ลดลงเมื่อมีปริมาณน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น สำหรับชุดการทดลองที่ไม่มีน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์พบว่าไม่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้เนื่องจากแหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ และเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มากขึ้น พบว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำมันที่อยู่บนผิวหน้าของอาหารทำให้การซึมผ่านของอากาศลดลงเช่นเดียวกับ Bora และ Kalita (2007) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. LBN 4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 6.0 หน่วยต่อมิลลิเมตร เมื่อใส่น้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ และ Kumar และคณะ (2005) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *B. coagulans* BTS-3 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด 0.68 หน่วยต่อมิลลิเมตร เมื่อใส่น้ำมันมัสตาร์ด 1 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Chaiyaso (2007) พบว่าปริมาณของน้ำมันมะกอก 1.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. multivorans* PSU 130 ได้สูงที่สุดถึง 32.4 หน่วยต่อมิลลิเมตร

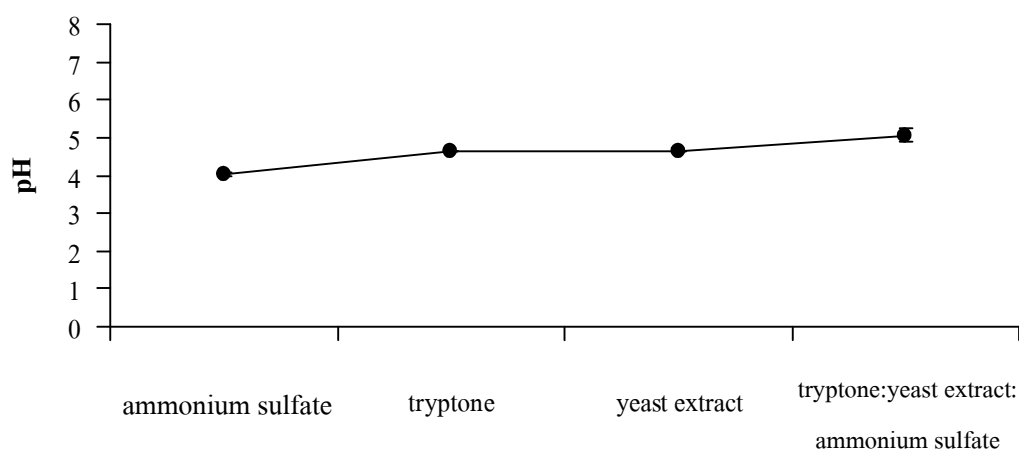
7.2 การศึกษาแหล่งและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยง *Burkholderia* sp. EQ3 ในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนเป็น ยีสต์สกัด, ทรีปโตน, แอมโมเนียมซัลเฟต และทรีปโตน: ยีสต์สกัด: แอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีชุดละ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารที่มีน้ำมันปลาที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีทรีปโตน, ทรีปโตน:ยีสต์สกัด:แอมโมเนียมซัลเฟต, ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ (Figure 15) ซึ่งชุดการทดลองที่มีทรีปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อเจริญได้ดีมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 5.0 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 1.8 หน่วยต่อมิลลิเมตร ส่วนทรีปโตน:ยีสต์สกัด:แอมโมเนียมซัลเฟต มีการเจริญของเชื้ออยู่ที่ 5.1 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 1.5 หน่วยต่อมิลลิเมตร ส่วนชุดการทดลองที่มียีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีค่าการเจริญของเชื้อสูงที่สุดจากค่าดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 5.6 และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส 1.0 หน่วยต่อมิลลิเมตร และชุดที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการ

เจริญจากการวัดค่าดูดกลืนแสงของเชื้อและกิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุดประมาณ 2.2 และ 0.88 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร จากการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถเจริญได้ดีในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Ruchi และคณะ (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าทริปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด เนื่องจากให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงถึง 185 IU/ml ส่วน Bora และ Kalita (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus* sp. LBN 4 พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีเมื่อมียีสต์สกัดและทริปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 3.48 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรเมื่อมียีสต์สกัด 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ส่วน Kumar และคณะ (2005) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย *B. coagulans* BTS-3 พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุด เมื่อมีเปปโตเนนและยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กิจกรรมเท่ากับ 0.67 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ส่วน Cordenons และคณะ (1996) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *A. calcoaceticus* พบว่าทริปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้ 2-3 เท่า และการศึกษาของ Chaiyaso (2007) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *B. multivorans* PSU 130 คือ ทริปโตเนน ซึ่งสามารถผลิตไลเปสมีกิจกรรม 20.5 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร

การศึกษาผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดย *Burkholderia* sp. EQ3 พบว่าทริปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของทริปโตเนนที่เหมาะสมที่ทำให้ *Burkholderia* sp. EQ3 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด โดยศึกษาปริมาณของทริปโตเนนที่ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดัง Figure 16 พบว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในอาหารที่มีทริปโตเนน 0.1 เปอร์เซ็นต์ และผลิตเอนไซม์ลดลงเมื่อปริมาณทริปโตเนนเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Chaiyaso (2007) พบว่าปริมาณของทริปโตเนนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *B. multivorans* PSU130 คือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อปริมาณทริปโตเนนมากขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากทริปโตเนนมีกรดอะมิโนหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และ Nashif และ Nelson (1953); Lawrence และคณะ (1967) ให้ความเห็นว่ากรดอะมิโนมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ส่วน Turki และคณะ (2009) ศึกษาการแยกไบโอแอสที่ฟเฟปไบต์ จากทริปโตเนนโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Yarrowia lipolytica* อธิบายว่าปริมาณของทริปโตเนนมีผลอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส เมื่อปริมาณของทริปโตเนนสูงจะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยอาจจะทำให้ปริมาณอาหารเสียนคุณค่าอันเนื่องมาจากปริมาณ โอลิโกเปปไทด์ที่มากเกินไป

A



B

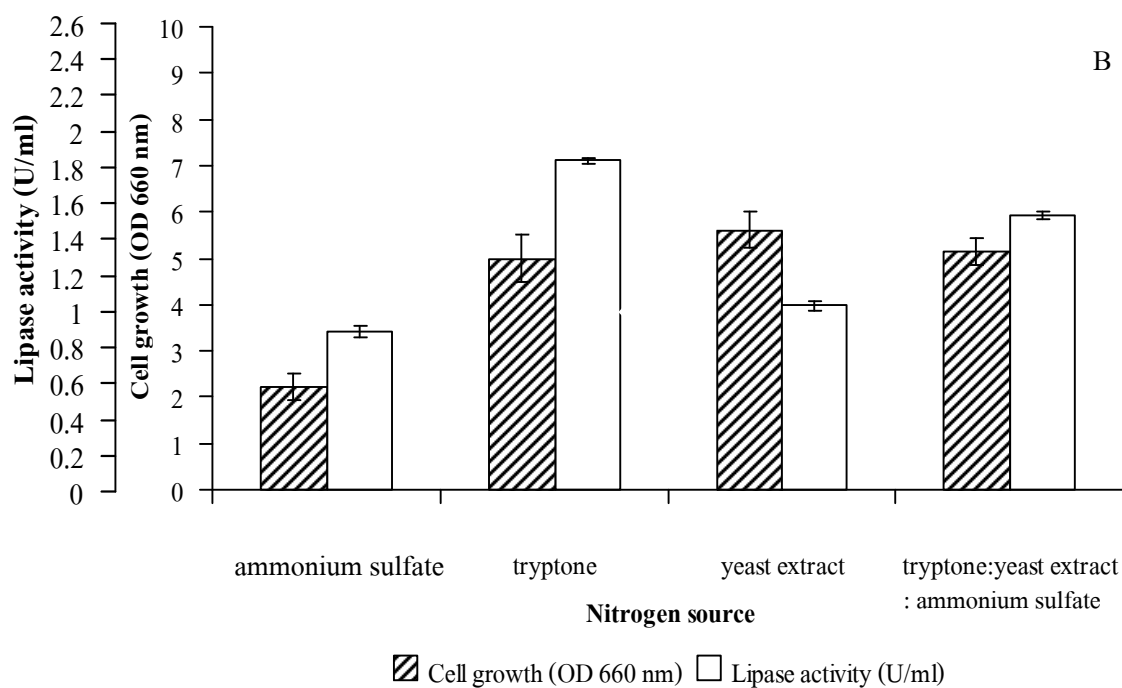


Figure 15. Effect of nitrogen sources on pH (A), growth and lipase activity (B) of *Burkholderia* sp. EQ3 grown in basal medium containing 1% extracted fish oil from pre-cooking condensate at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h.

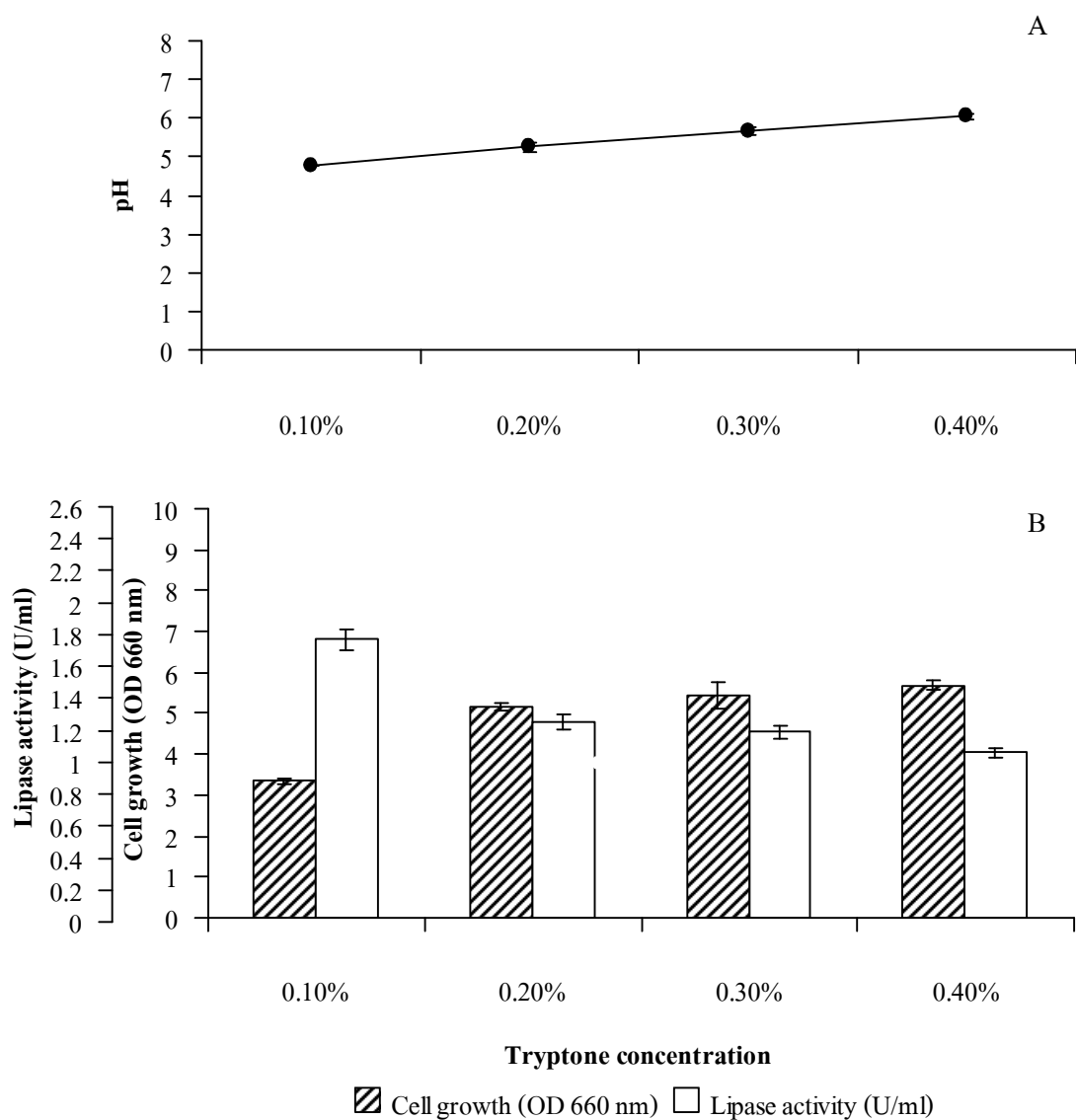


Figure 16. Effect of tryptone concentration on pH (A), growth and lipase activity (B) of *Burkholderia* sp. EQ3 grown in basal medium containing 1% extracted fish oil from pre-cooking condensate at 37°C with shaking speed of 200 rpm for 12 h.

8. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสด้วยการตกตะกอน

จากการเลี้ยงเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ทำการศึกษาแล้วข้างต้นปริมาณมากในอาหารเหลวพื้นฐานประกอบด้วย ทริปโตเนน 1.0 กรัม, K_2HPO_4 2.0 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม และ $CaCl_2$ 0.15 กรัม พีเอช 6.0 เติมน้ำมันปลาจากน้ำนิ่งปลาปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบด้วยสารตกตะกอนต่างๆ ดังนี้ การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ โดยจะทำการตกตะกอนเอนไซม์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ก่อนแล้วนำส่วนใสไปตกตะกอนด้วยเกลืออิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ โดยการชั่งเกลือแล้วนำไปบดให้ละเอียด และการตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ คือ อะซิโตน และเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:3 ได้ผลการทดลองดังแสดงใน Table 5 พบว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้อีก 10.3 เปอร์เซ็นต์ แต่มีปริมาณโปรตีนตกสูงมาก และจะสังเกตได้ว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวนั้น เมื่อหมุนเหวี่ยงแล้ว ตะกอนที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลเข้ม เกาะกันเป็นแผ่นตะกอนบางๆ ลอยอยู่ด้านบนสารละลายและตกตะกอนข้างหลอด หากต่อการเก็บตะกอน ทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์ที่น้อย ส่วนชุดการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ในอัตราส่วน 1:3 คือ อะซิโตน พบว่าสามารถตกตะกอนเอนไซม์ไลเปสได้ถึง 89.3 เปอร์เซ็นต์ และเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้ 32.4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว พบว่าอะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการตกตะกอนเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia* sp. EQ3 อะซิโตนและเอทิลแอลกอฮอล์จะไปลดค่ากิจกรรมของน้ำโดยมีผลต่อค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) ของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายลดลงทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตยบนโมเลกุลโปรตีนมีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ จะเกิดการเข้ามารวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมาได้ (ชรินทร์ เตชะพันธุ์, 2542) และการตกตะกอนจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นเมื่อค่าคงที่ไดอิเล็กตริกลดลง อะซิโตนมีค่าคงที่ไดอิเล็กตริกเท่ากับ 21 เอทิลแอลกอฮอล์เท่ากับ 30 ดังนั้นอะซิโตนจึงสามารถตกตะกอนเอนไซม์ได้ดีกว่าเอทิลแอลกอฮอล์ อีกทั้งยังเป็น polar aprotic solvent ดังนั้นเมื่อใส่อะซิโตนลงไปอะซิโตนก็จะแย่งจับกับน้ำทำให้ค่าไดอิเล็กตริกคอนสแตนท์

แวกต์ลุ่มลดลง จึงทำให้โปรตีนตกตะกอน และสามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ได้ถึง 9.4 เท่า และนำเอนไซม์ที่ทำการตกตะกอนแล้วไปศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปสและการประยุกต์ใช้ต่อไป

Table 5. Precipitation of crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Supernatant	171.6	95	0.5	100	1
Acetone 1:3	18.1	84.8	4.7	89.3	9.4
Ethanol 1:3	21.3	30.8	1.4	32.4	2.8
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50%	7.2	18.9	2.6	22.7	5.2
(NH ₄) ₂ SO ₄ 50%-80%	26.1	9.8	0.4	10.3	0.8

9. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

9.1 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม

เมื่อนำตะกอนของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตามวิธี two-phase emulsion method ดัดแปลงจากวิธีการของ Lee และ Rhee (1993) ทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ 5 อุณหภูมิ ดังนี้ 10, 25, 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองดัง Figure 17 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมคงเหลือสูงสุด รองลงมา คือ 30, 37, 45 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 นั้นเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง เป็นอุณหภูมิในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิต่ำที่ 10 องศาเซลเซียส กิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์ลดลงอย่างมากเหลือเพียง 17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้น พบว่ากิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์ค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ 34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

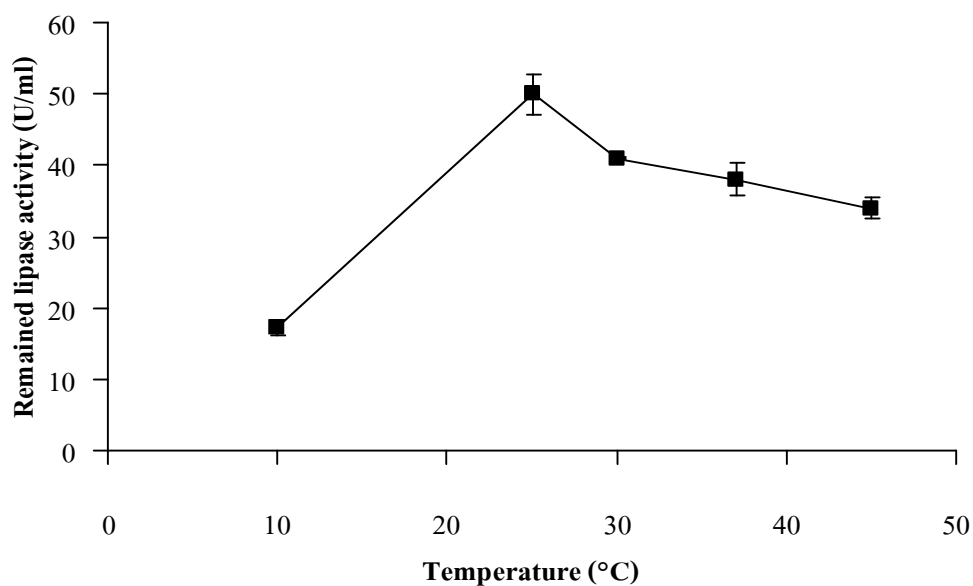


Figure 17. Effect of temperature on the activity of crude lipase produced by *Burkholderia* sp. EQ3 (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0 and 300 rpm for 30 min).

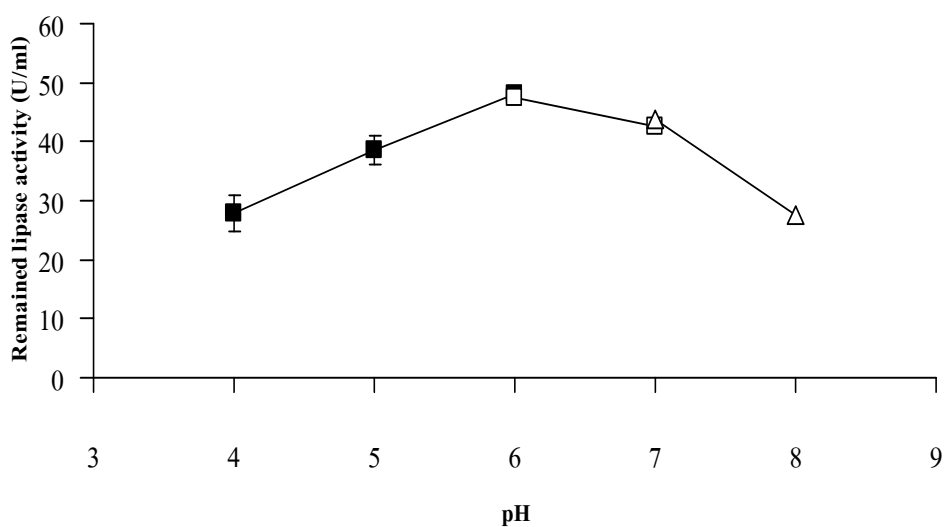


Figure 18. Effect of pH on the activity of crude lipase produced by *Burkholderia* sp. EQ3 (reaction condition: palm oil as substrate at 25°C and 300 rpm for 30 min). ■ acetic buffer pH 4.0, 5.0 and 6.0; □ phosphate buffer pH 6.0 and 7.0; △ tris-HCl pH 7.0 and 8.0.

ผลการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ไลเปสให้กิจกรรมสัมพัทธ์สูงในช่วงพีเอชปานกลางที่ 6.0-7.0 (Figure 18) โดยให้กิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดที่พีเอชเป็น 6.0 และเมื่อค่าพีเอชต่ำ คือ ที่พีเอช 4.0 และ 5.0 เอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญอยู่ที่ 28 และ 38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเมื่อเพิ่มพีเอชเป็น 7.0 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะลดลงเพียงเล็กน้อยโดยเหลือ 43 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่พีเอช 8.0 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมากคงเหลือเพียง 27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ Kiran และคณะ (2008) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. (MSI057) ทำปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอช 8.0-9.0 ส่วน Joseph และคณะ (2006) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาที่ 20 องศาเซลเซียส เมื่อ 25 องศาเซลเซียส จะยังคงเหลือ 90 เปอร์เซ็นต์ และมีพีเอชที่เหมาะสมในช่วง 6.0-7.0 แต่พีเอช 7.0 ให้กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สูงที่สุด จากการทดลองของ Achamma และคณะ (2003) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus mycoides* มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสและพีเอช 8.0 และ Lotrakul และคณะ (1997) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Aeromonas sobria* LP004 มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานเป็น 6.0 และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ส่วน Chaiyaso (2007) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจาก *B. multivorans* PSU AH-130 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุดที่อุณหภูมิเหมาะสม 55 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 8.0

9.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิและพีเอช

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 โดยศึกษาทั้งอุณหภูมิ และพีเอชของเอนไซม์ จึงทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ 7 อุณหภูมิ ดังนี้ 4, 10, 25, 30, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส โดยบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองได้แสดงใน Figure 19 พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำและให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิที่ทำการทดลองสูงขึ้น กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะลดลงโดยแปรผันตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น รองลงมา คือ 10 โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์กว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 ถึง 45 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ 58-63 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือ 46 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 นั้นสามารถคงกิจกรรมไว้เมื่ออุณหภูมิต่ำ

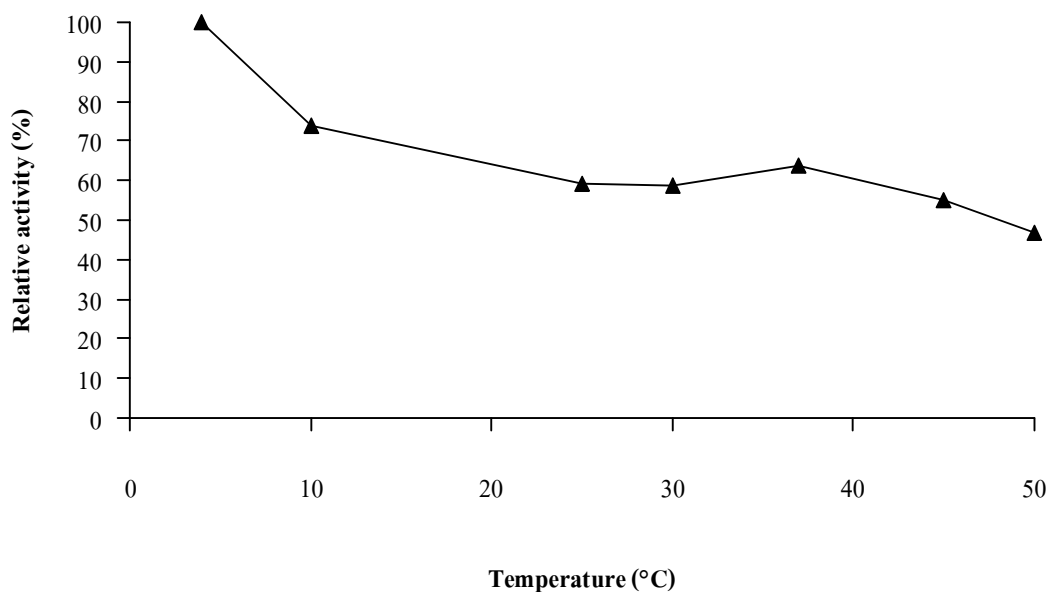


Figure 19. Effect of temperature on the stability of crude lipase produced by *Burkholderia* sp. EQ3 for 1 h at pH 6.0 (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0, 25°C and 300 rpm for 30 min).

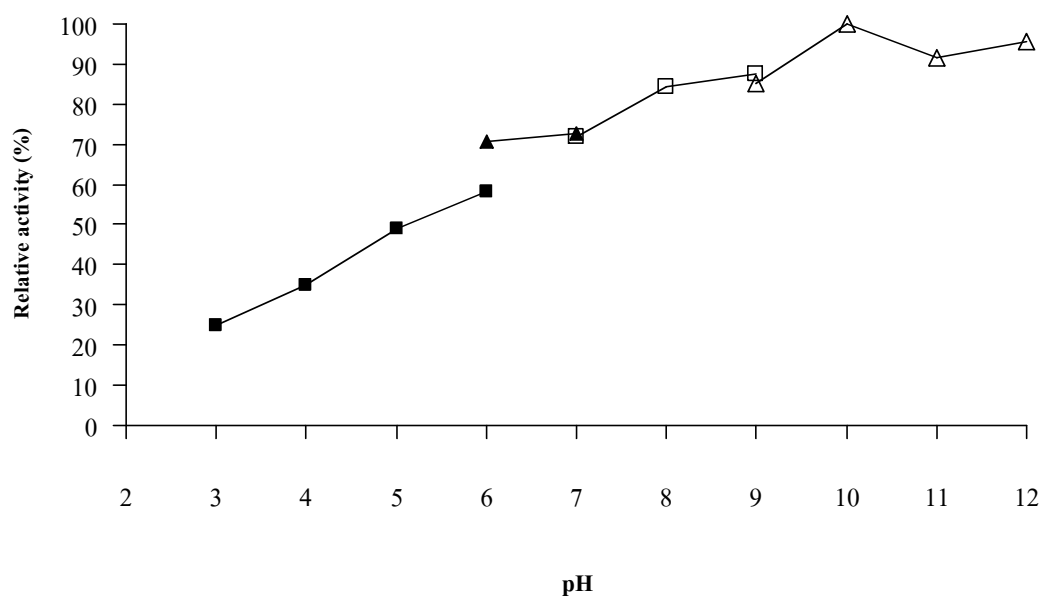


Figure 20. Effect of pH on the stability of crude lipase produced by *Burkholderia* sp. EQ3 at 25°C for 1 h. (reaction condition: palm oil as substrate at pH 6.0, 25°C and 300 rpm for 30 min). ■ acetic buffer pH 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0; ▲ phosphate buffer pH 6.0 and 7.0; □ tris-HCl pH 7.0, 8.0 and 9.0; Δ glycine-NaOH pH 9.0, 10.0, 11.0 and 12.0.

ผลการศึกษาความเสถียรต่อพีเอชของเอนไซม์ (Figure 20) โดยบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเช่นกัน พบว่าเอนไซม์ไลเปสให้กิจกรรมสัมพัทธ์สูงในช่วงพีเอชที่เป็นค่าที่พีเอช 9.0-12.0 โดยให้กิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดเมื่อพีเอชเท่ากับ 10.0 ซึ่งกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะเพิ่มตามพีเอชที่เพิ่มขึ้น และเมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 9.0 คือ ที่พีเอช 6.0 ถึง 8.0 เอนไซม์ไลเปสยังคงมีกิจกรรมสัมพัทธ์เหลืออยู่กว่า 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพีเอชลดลงเป็น 3.0 ถึง 5.0 พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์จะลดลงอย่างมากโดยเหลือน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ Abada (2008) ซึ่งทำการศึกษาการผลิตและคุณลักษณะของเอนไซม์จาก *Bacillus stearothermophilus* AB-1 พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้ชอบและเสถียรที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 35-40 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เป็นกลางเท่ากับ 7.5 หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์คงเหลือกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Rathi และคณะ (2000); Bradoo และคณะ (2002) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. มีความเสถียรที่พีเอชช่วงกว้างตั้งแต่ 6-12 มากกว่า 12 ชั่วโมง การศึกษาของ Chaiyaso (2007) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *B. multivorans* เสถียรที่พีเอช 7.0-9.0 และอุณหภูมิ 35-55 องศาเซลเซียส ส่วน Wang และคณะ (2009) พบว่าเอนไซม์ไลเปสเสถียรสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ที่พีเอชเท่ากับ 11.0 เช่นเดียวกับการทดลองของ Ghanem และคณะ (2000) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus alcalophilus* B-M20 มีความเสถียรที่พีเอช 10.0-10.8 มากที่สุด และมีกิจกรรมคงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 11.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

10. การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปส

10.1 การเปรียบเทียบการผลิตแวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia* sp. EQ3

กับเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้า

จากการนำเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้า 5 ชนิด คือ Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Novozyme 435, Lipase PS และ Lipase AK และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 มาศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมัน โดยเอนไซม์ไลเปสตรังรูปทางการค้าทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 24 พบว่า Lipozyme RM IM, Novozyme 435 และ Lipozyme TL IM และเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 มีความสามารถในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 92, 91 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังผลการทดลองดังแสดงใน

Figure 21 ส่วนเอนไซม์ Lipase PS ซึ่งผลิตจาก *Pseudomonas cepacia* และ Lipase AK ที่ผลิตจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* สังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ปริมาณที่น้อยมาก โดยเอนไซม์ตรึงรูปทั้งสองถูกตรึงด้วย accurel EP 100 (<400 um) ซึ่งเป็นวัสดุตรึงที่เป็นโพลีเมอร์ที่ไม่มีขั้ว ทำปฏิกิริยากับสารที่ไม่มีขั้วได้ตัวอย่างเช่นน้ำมัน โดยจะไปช่วยเพิ่มการสัมผัสกันระหว่างเอนไซม์กับน้ำมัน ซึ่งทั้งสองเอนไซม์เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ จากการศึกษาของ Fajardo และคณะ (2006) รายงานว่าเอนไซม์ Lipase PS สามารถทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้น้อยกว่าเอนไซม์อื่นๆ อีกทั้ง Utsugi และคณะ (2009) ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสในการทำทรานส์เอสทิลเลชันของทรานส์เอสทิลกลีเซอรินโดยใช้เอนไซม์ไลเปส 12 ชนิด พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมในการย่อยสลายที่สูงอย่าง Lipase PS, Lipase AK, Lipase AS เป็นต้น จะสามารถทำปฏิกิริยาทรานส์เอสทิลเลชันได้ดี จากการทดลองนี้เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีกิจกรรมการย่อยสลายสูงที่สุด และปฏิกิริยาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันส่วนใหญ่มีแต่กรดไขมันอิสระ ซึ่งอาจทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ของกรดไขมันแบบการสังเคราะห์เอสเทอร์ (ester synthesis) ได้น้อย ส่วน Lipozyme RM IM ผลิตจาก *Mucor miehei* ถูกตรึงด้วย macroporous anion exchange resin และ Novozyme 435 ตรึงด้วย macroporous acrylic resin ทั้งสองเป็นเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันและอินเตอร์เอสเทอร์ฟิเคชันได้ดี อีกทั้งยังทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ดังการศึกษาของ Roenne และคณะ (2005) พบว่าเอนไซม์ไลเปส Novozyme 435 ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันของกรดแลกติกและเฮกซะเดคานอลได้ 79.2 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นหรือปฏิกิริยาที่ไม่มีขั้วสูง โดยเฉพาะสารทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ อาทิเช่น การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ อีกทั้งยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิและสภาวะที่แห้ง (Tufvesson, 2008) จากการทดลองยังพบว่า เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์นั้นสามารถทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะ ซึ่ง Lipozyme RM IM และ Novozyme 435 สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ในปริมาณที่สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Salis และคณะ (2003) พบว่าแวกซ์เอสเทอร์ที่สังเคราะห์จากเอนไซม์ตรึงรูปทางการค้าทั้งสองนั้นสามารถสังเคราะห์แวกซ์ได้สูงสุดที่ 5 ชั่วโมง และสามารถสังเคราะห์ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองนี้จึงทำการคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปที่สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงที่สุดทั้งสองเอนไซม์และเอนไซม์ไลเปสอย่างหายาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 มาศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

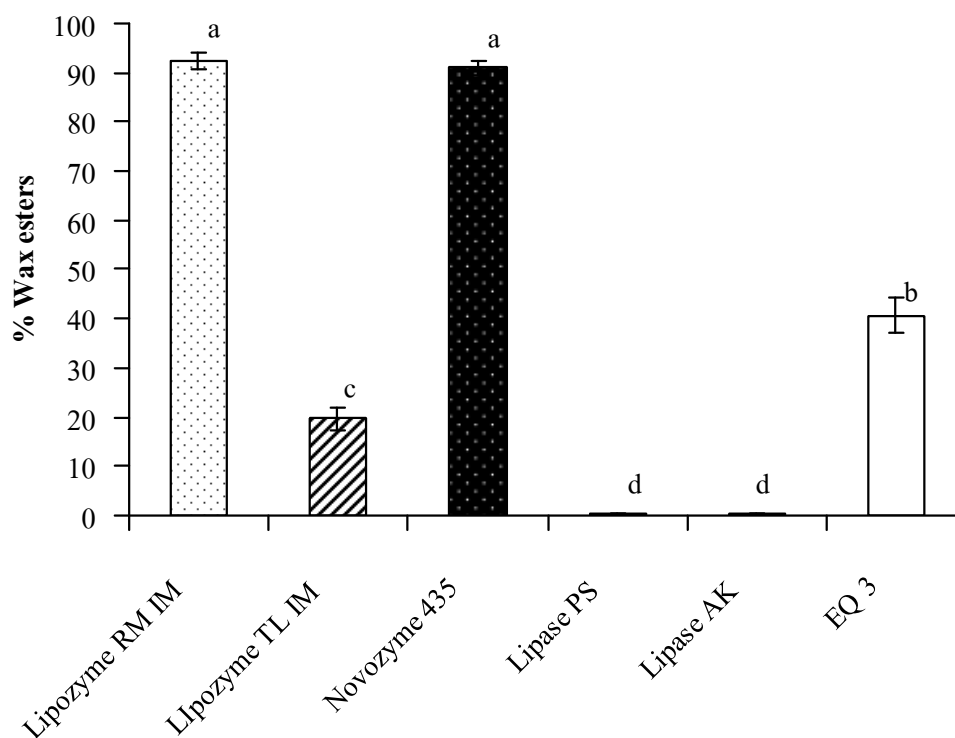


Figure 21. Screening of wax esters production by 5 commercial immobilized lipases (reaction mixture: fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:3 mol/mol), hexane 1 ml and enzyme 1 U at 45°C and 300 rpm for 24 h) and crude lipase of *Burkholderia* sp. EQ3. (reaction mixture: fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:3 mol/mol), hexane 1 ml and enzyme 1 U at 37°C and 200 rpm for 24)

10.2 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

จากการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ของเอนไซม์ไลเปสตรังรูป Lipozyme RM IM และ Novozyme 435 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เอนไซม์ในปริมาณที่เท่ากัน คือ 1 หน่วย พบว่าเอนไซม์ตรังรูปทั้งสองมีการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้อย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์ตรังรูป Lipozyme RM IM สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุดภายในเวลา 3 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 22A ซึ่งสังเคราะห์ได้ 92.61 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 3 พบว่ามีการสังเคราะห์ค่อนข้างคงที่ไม่มีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเอนไซม์ตรังรูป Novozyme 435 สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุดภายในเวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งสังเคราะห์ได้ 92.88 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีการสังเคราะห์ค่อนข้างคงที่ไม่มีมีความแตกต่างกันอย่าง

มีนัยสำคัญ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Salis และคณะ (2003) ทำการศึกษาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้ heavy triglyceride fraction ของไขมันจากน้ำมันมะกอกโดยใช้เอนไซม์ไลเปส Lipozyme RM IM และ Novozyme 435 พบว่าแวกซ์เอสเทอร์ที่สังเคราะห์จากเอนไซม์ตรีงรูปทางการค้าทั้งสองนั้นสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุดที่ 5 ชั่วโมง และสามารถสังเคราะห์ได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ 50 มิลลิกรัม การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันนั้นขึ้นอยู่กับคุณสมบัติและปริมาณเอนไซม์ จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ตรีงรูป Lipozyme RM IM สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้เร็วกว่า Novozyme 435 เนื่องจากปริมาณของเอนไซม์ที่ใส่ คือ 1 ยูนิตจากการวัดกิจกรรมการย่อยสลาย ซึ่งเอนไซม์ตรีงรูป Lipozyme RM IM มีกิจกรรมเท่ากับ 0.060 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ดังนั้นจึงต้องใช้ 16.75 มิลลิกรัมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยมีปริมาณมากกว่าเอนไซม์ไลเปสตรีงรูป Novozyme 435 ซึ่งมีกิจกรรมจากการย่อยสลายมากถึง 0.241 ยูนิตต่อมิลลิกรัม จึงใช้ปริมาณ 4.1 มิลลิกรัม ปริมาณเมื่อดัวพวงของเอนไซม์ Lipozyme RM IM มีมากกว่าและสารละลายทั้งหมดมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อเขย่าทำปฏิกิริยาพื้นที่ผิวการสัมผัสของเอนไซม์มากกว่าทำให้การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์เกิดได้เร็วกว่า คือ 3 ชั่วโมง ส่วน Novozyme 435 สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ปริมาณสูงสุดที่ 9 ชั่วโมง แต่เอนไซม์ไลเปสตรีงรูปทั้งสองสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ใกล้เคียงกันโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งราคาของ Novozyme 435 ประมาณ 75000 บาทต่อกิโลกรัม และ Lipozyme RM IM ราคา 30000 บาทต่อกิโลกรัม คิดราคาต่อปริมาณที่ใช้ของ Novozyme 435 ได้เป็น 0.30 บาท และ Lipozyme RM IM ได้เป็น 0.48 บาท จึงเลือกเอนไซม์ Novozyme 435 ศึกษาต่อไป

การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ของเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบที่ผลิตจากเชื้อ *Burkholderia* sp. EQ3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สภาวะในการทำปฏิกิริยาโดยใช้ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:2 (โมล/โมล) (137.3 μmol /274.8 μmol) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ใช้เอนไซม์ในปริมาณที่แตกต่างกัน คือ 1, 5, 10, 20, 30 และ 40 ยูนิต ที่เวลาต่างๆ พบว่าเปอร์เซ็นต์ของแวกซ์เอสเทอร์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณของเอนไซม์ที่มากขึ้น (Figure 22B) โดยเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 ปริมาณ 1, 5, 10, 20, 30 และ 40 ยูนิต สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 25.15, 48.23, 75.0, 92.0, 96.69 และ 97.24 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์แปรผันตามระยะเวลาและความเข้มข้นของเอนไซม์ ปริมาณเอนไซม์ที่ 40 ยูนิต สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้เร็วและปริมาณสูงที่สุดภายในเวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 89.4 เปอร์เซ็นต์ และมีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่

จนถึง 93.25 เปอร์เซ็นต์ที่ 15 ชั่วโมง โดยการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ถึง 15 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบประมาณ 30 ยูนิต สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้เร็วและปริมาณสูงรองลงมา ซึ่งสังเคราะห์ได้ 85.10 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 9 ชั่วโมง และการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ 30 และ 40 ยูนิต ที่เวลา 9 ชั่วโมง ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบประมาณ 20, 10, 5 และ 1 ยูนิต สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้น้อยกว่า ปริมาณ 66.32, 43.76, 23.47, 6.8 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 9 ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองทั้งหมดคาดว่าหากทำปฏิกิริยาเป็นเวลานานมากขึ้น เอนไซม์จะสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้อย่างสมบูรณ์ทุกความเข้มข้น และพบว่าเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบสามารถทำปฏิกิริยาได้ในสถานะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ได้ ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ และปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน คือ 40 ยูนิต ที่เวลา 9 ชั่วโมง

การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่มีผลต่อการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ตรึงรูป Novozyme 435 ความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ยูนิต ทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้ไขมันปลาต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:3 (โมล/โมล) (137.3 μmol /412.47 μmol) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเอนไซม์ไลเปสตรึงรูปเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เป็นอย่างมาก โดยเปอร์เซ็นต์ของการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณของเอนไซม์ที่มากขึ้น ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 23 ซึ่งการสังเคราะห์เกิดอย่างรวดเร็วใน 1 ชั่วโมงแรกและสูงสุดที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นการสังเคราะห์ก็จะคงที่ การที่ปริมาณการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์คงที่บ่งบอกว่าสับสเตรทที่อยู่ในปฏิกิริยานั้นอาจจะหมด (Rahman *et al.*, 2001) ปริมาณของเอนไซม์มีบทบาทสำคัญมากต่อการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันในด้านผลได้ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งผลผลิตที่เพิ่มมากขึ้นจะแปรผันตามปริมาณเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้น (Radzi *et al.*, 2005; Aracil *et al.*, 1992) ซึ่งจากการทดลองปริมาณของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 1 ยูนิตสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 87.82 เปอร์เซ็นต์ ถึงปริมาณ 2 ยูนิต ซึ่งสังเคราะห์ได้ 89.36 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 3 ชั่วโมงนั้น เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าให้ผลการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ Novozyme 435 ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของไขมันปลา คือ 1 ยูนิต

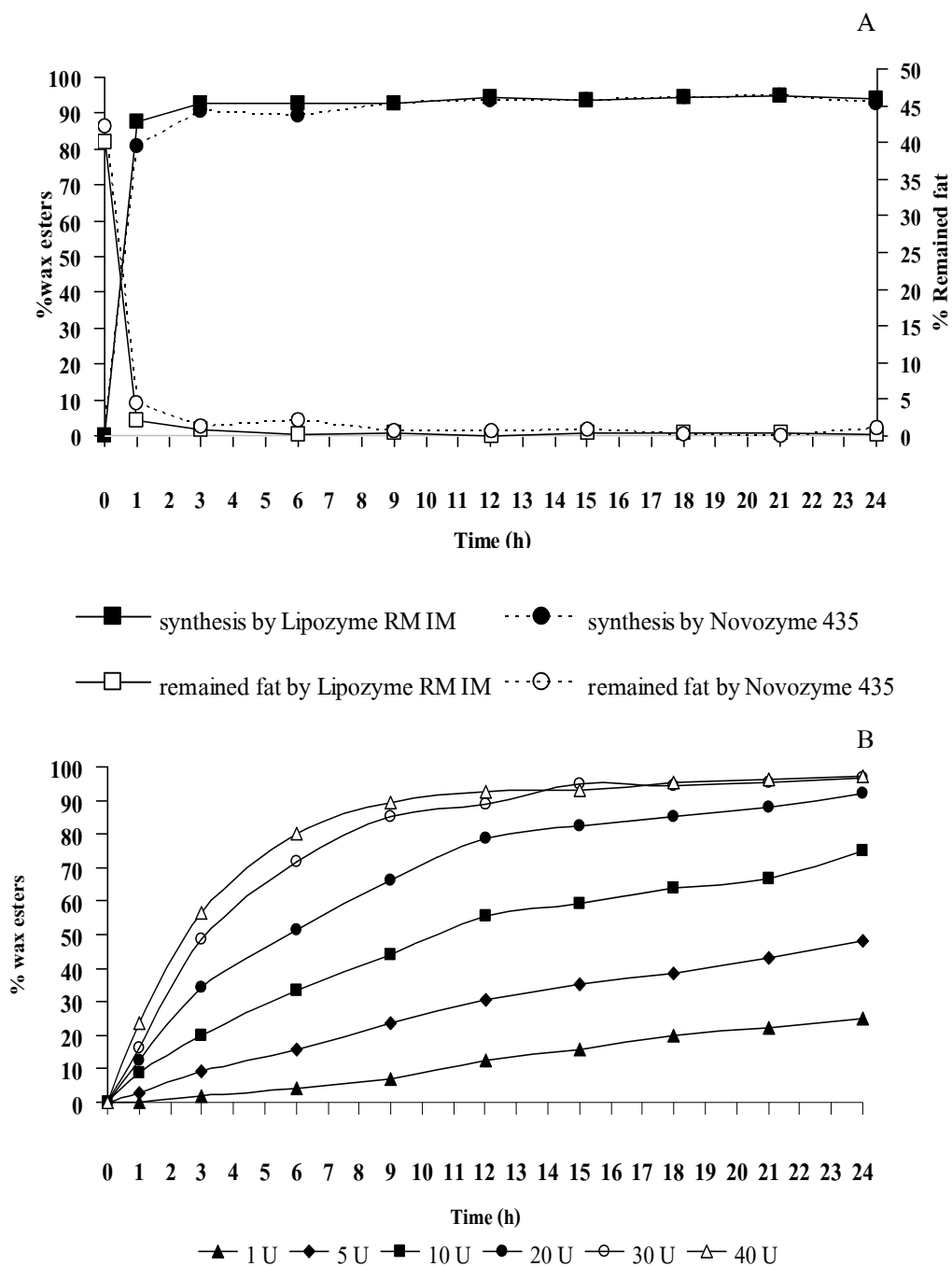


Figure 22. Time courses of wax esters synthesis from crude fat by Lipozyme RM IM and Novozyme 435 (A) (reaction mixture: fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:3 mol/mol), hexane 1 ml and enzyme 1 U at 45°C and 300 rpm for 24 h) and crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 (B) (reaction mixture: fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:2 mol/mol), hexane 1 ml, at 37°C and 200 rpm for 24 h).

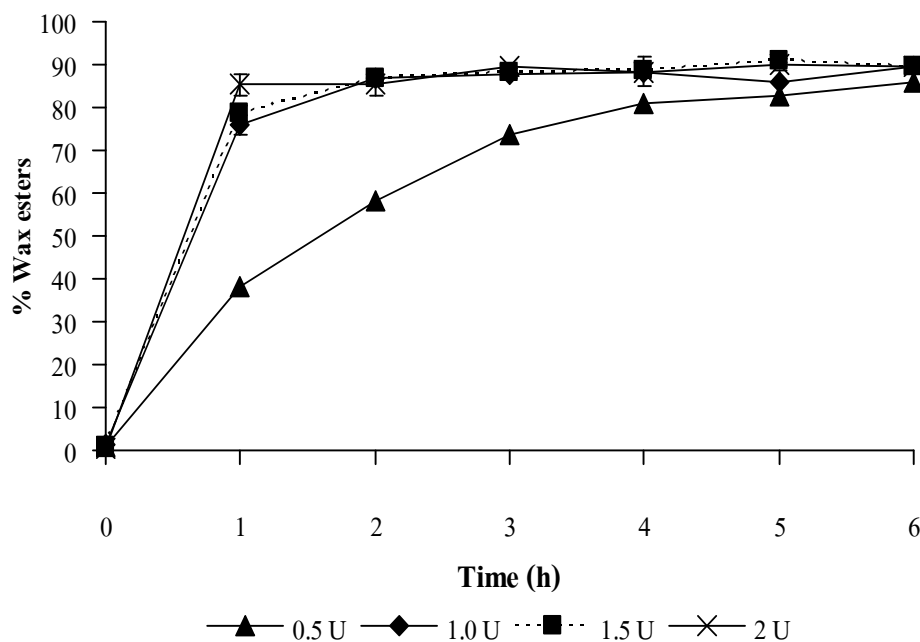


Figure 23. Effect of Novozyme 435 concentrations on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake. (reaction condition: fat extracted from fat cake 115.3 mg and cetyl alcohol 100 mg (1:3 mol/mol), at 37 °C and 300 rpm for 6 h).

10.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

การศึกษาอุณหภูมิต่างๆ ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูป Novozyme 435 ปริมาณ 1 ยูนิต ทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันโดยใช้ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:3 (โมล/โมล) ($137.3 \mu\text{mol}/412.47 \mu\text{mol}$) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิมีบทบาทสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของเอนไซม์ จากการทดลองทั้ง 3 อุณหภูมิ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์เป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 3 และคงที่หลังจาก 3 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 24A ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ คือ 37 องศาเซลเซียส โดยสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 90.11 เปอร์เซ็นต์ภายใน 3 ชั่วโมง อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ 87.92 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ 86.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 ปริมาณ 40 ยูนิต ทำปฏิกิริยาโดยใช้ไขมันปลาต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:2 (โมล/โมล) ($137.3 \mu\text{mol}/274.8 \mu\text{mol}$) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามผลการทดลองดัง Figure 24B

พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 89.6 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 9 ชั่วโมง และ 93.41 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ขณะที่การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 92.57 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 9 ชั่วโมง และ 95.38 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 92.86 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 9 ชั่วโมง และ 95.28 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง แต่เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ทั้ง 3 อุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 6, 9 และ 12 ชั่วโมง และจากการทดลองดังกล่าวจึงเลือกการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia* sp. EQ3 มีคุณสมบัติสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่ 25-37 องศาเซลเซียส (Figure 17) และไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูง โดยทั่วไปอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเพิ่มอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท เพราะต้องการพลังงานในการกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ อีกทั้งอุณหภูมิสูงสามารถลดคุณสมบัติความหนืดของแวกซ์เอสเทอร์ แต่เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนมักจะ ไม่คงตัวต่อความร้อนทำให้เสียสภาพได้ ดังนั้นเอนไซม์ทุกตัวมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกัน (สารโรจน์ ศิริสันตนิยกุล, 2538) จากการศึกษาของ Rahman และคณะ (2001) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ oleyl oleate โดย Lipozyme IM-20 คือ 50 องศาเซลเซียส ได้อธิบายว่าพลังงานจากความร้อนจะเร่งปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท ทั้งนี้เอนไซม์จะต้องสามารถทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงได้ และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จะลดลง เนื่องจากอุณหภูมิสูงจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sin และคณะ 2005 ซึ่งสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากน้ำมันปาล์มโดยใช้ Lipozyme RM IM สังเคราะห์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ส่วนผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับ Salis และคณะ (2003) พบว่าเอนไซม์ไลเปส Lipozyme RM IM สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากไขมันที่แยกจากน้ำมันมะกอก ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Radzi และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ Novozyme 435 ในการสังเคราะห์โอลิอิลโอลิเอต ซึ่งได้เลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการศึกษาอื่นๆ ส่วน Radzi และคณะ (2005) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ด้วย Novozyme 435 คือ 40-60 องศาเซลเซียส อัตราการระเหยของน้ำในเอนไซม์จะเพิ่มมากขึ้นทำให้ตำแหน่งการจับจุดอิมตัวของผลิตภัณฑ์สูงขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น และเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส อาจจะทำให้เกิดการสันตะเทียนและการเคลื่อนที่ของโมเลกุลส่งผลต่อพันธะไฮโดรเจนและพันธะอื่นๆ ในโครงสร้างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ไม่มีประสิทธิภาพ

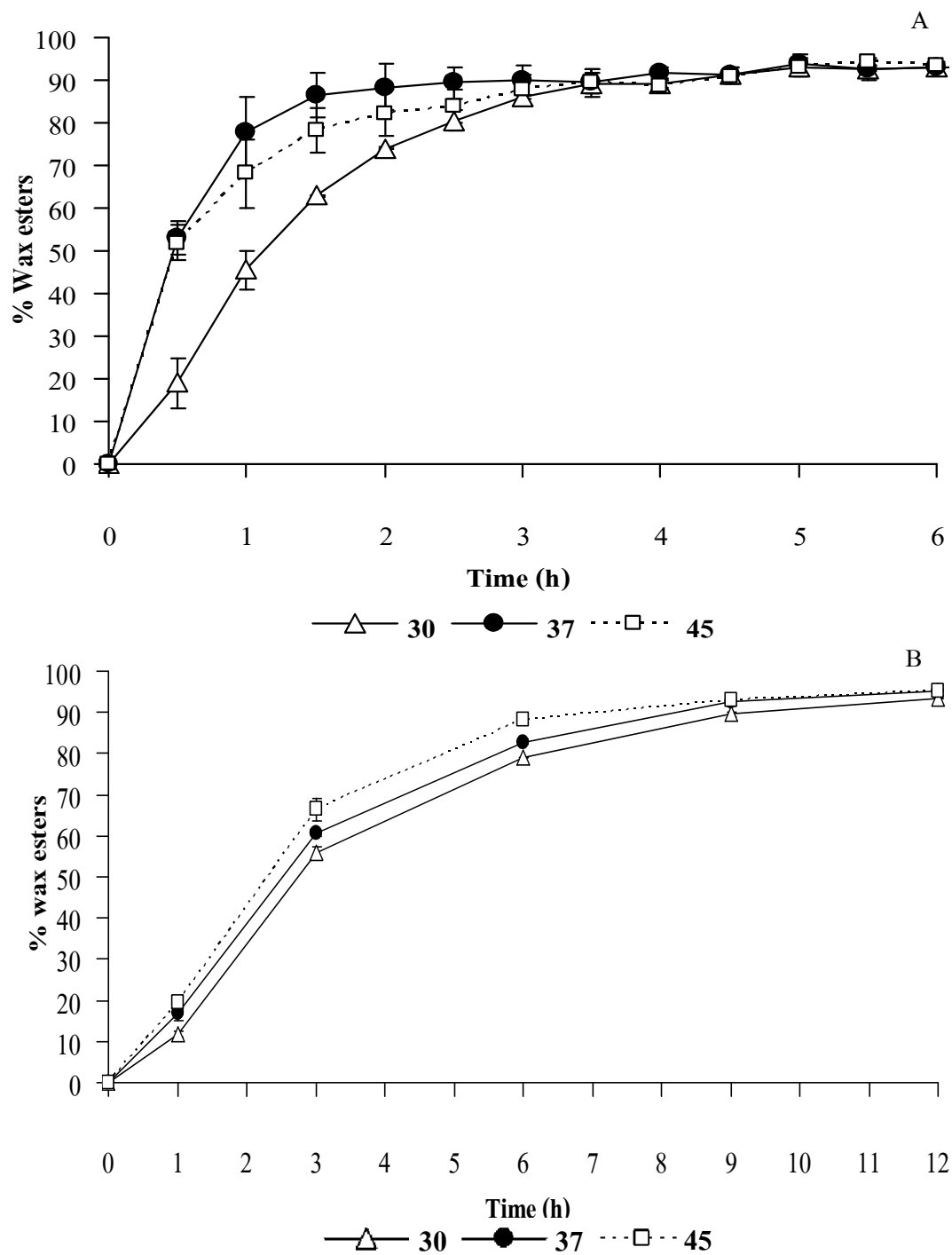


Figure 24. Effect of temperature on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake by Novozyme 435 (A) (reaction condition: enzyme 1 U, substrate molar ratio 1:3 and 200 rpm for 6 h) and crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 (B) (reaction condition: enzyme 40 U, substrate molar ratio 1:2 and 200 rpm for 12 h).

10.4 การศึกษาอัตราส่วนโมลที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

การศึกษาอัตราส่วน โมลที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ตรีงรูป Novozyme 435 ปริมาณ 1.0 ยูนิต ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไขมันที่สกัดได้จาก ก้อนไขมัน ต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 (โมล/โมล) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการสังเคราะห์ โดยใช้เอนไซม์อย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 ปริมาณ 40 ยูนิต ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน โดยใช้ไขมันปลาต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 (โมล/โมล) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 25A และ 25B พบว่าอัตราส่วน โมลที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 1:2 สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดย Novozyme 435 ได้ปริมาณสูงที่สุด 92.49 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 3 ชั่วโมง และเอนไซม์อย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 สังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ปริมาณสูงที่สุด 92.42 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 9 ชั่วโมง หลังจากนั้นการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและค่อนข้างคงที่ 94.22 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแนวโน้มการเพิ่มอัตราส่วนของซีทิลแอลกอฮอล์ในการทำปฏิกิริยามากกว่า 2 เท่า จะทำให้เปอร์เซ็นต์ของแวกซ์เอสเทอร์ที่ได้ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Radzi และคณะ (2005) ได้ศึกษาอัตราส่วน โมลที่มีผลต่อการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ oleyl oleate พบว่าอัตราส่วนของกรดโอเลอิกต่อโอเลอิลแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมคือ 1:2 ซึ่งสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้มากที่สุดปริมาณ 90.32 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอัตราส่วน โมลการผลิตจะลดลง เนื่องจากปริมาณของแอลกอฮอล์ที่มากเกินไปอาจจะไปทำลายชั้นของน้ำในเอนไซม์ไลเปสตรีงรูป ทำให้การทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเกิดขึ้นน้อยลง ส่วนโอเลอิลแอลกอฮอล์เป็นแอลกอฮอล์ของกรดไขมันที่มีความหนาแน่นสูงจะนั้น เมื่อมีการเพิ่มปริมาณของแอลกอฮอล์จะทำให้แอลกอฮอล์ไปแทนที่ตัวทำละลายอินทรีย์และอาจทำให้ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทถูกยับยั้งได้ Erbedinger และคณะ (1998); Radzi และคณะ (2005) ได้อธิบายว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์ของกรดไขมันมากขึ้นจะทำให้สับสเตรทมีความเข้มข้นมากและอาจจะทำให้ความหนืดของสารในการทำปฏิกิริยารอบๆ เอนไซม์มีมากขึ้น ทำให้การผสมกันของสารเกิดอย่างไม่มีประสิทธิภาพส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาลดลง

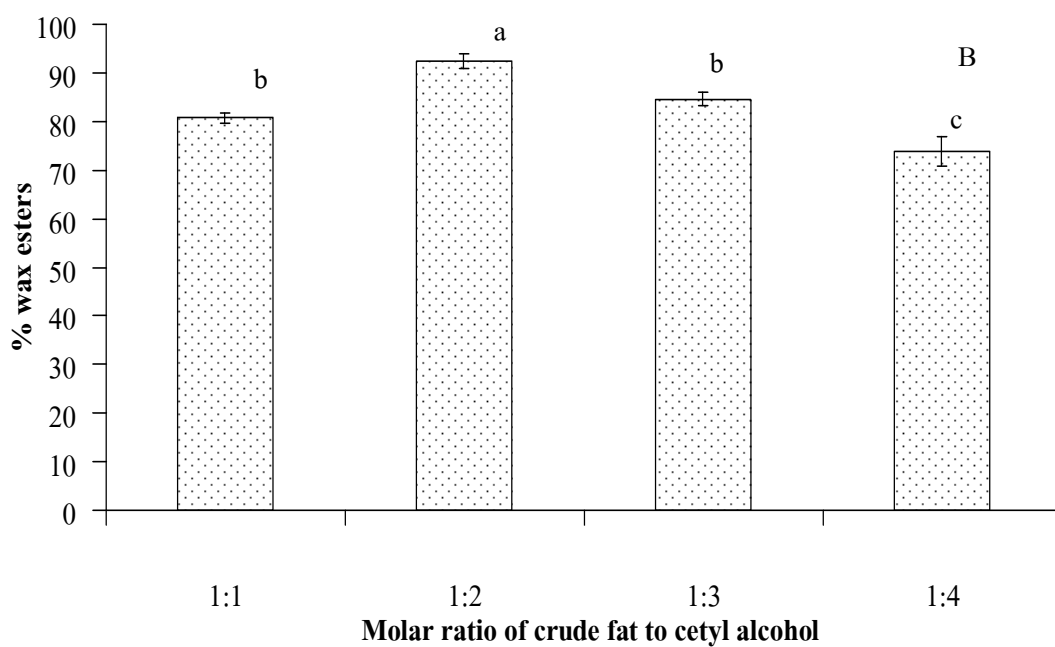
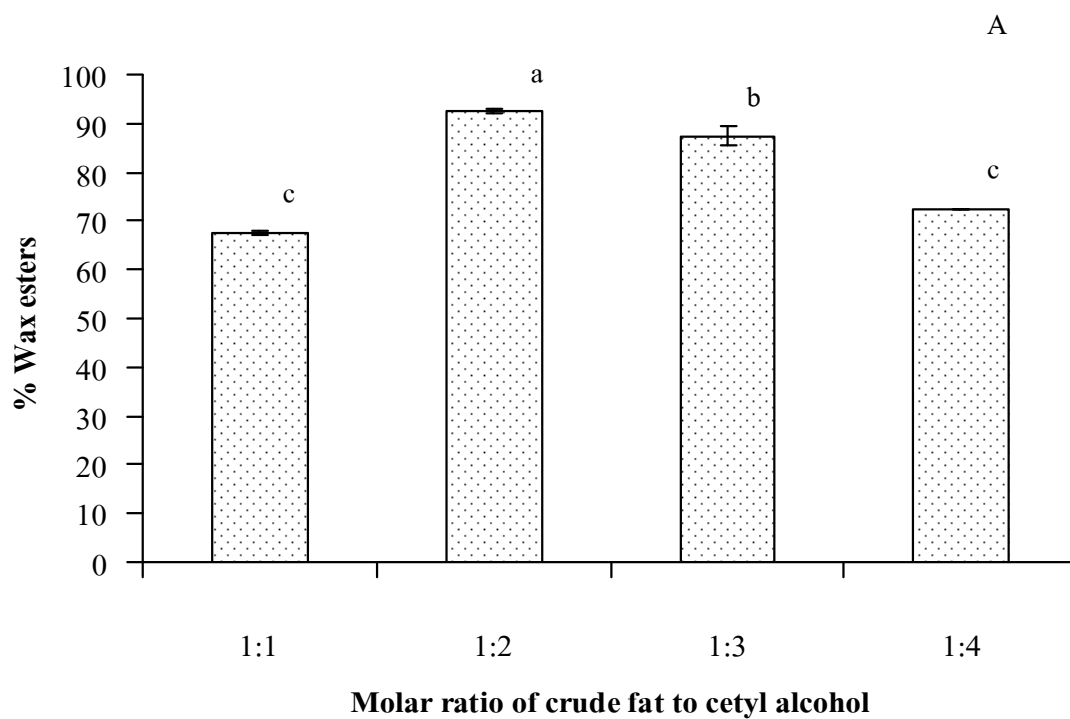


Figure 25. Effect of molar ratio of fat extracted from fat cake and cetyl alcohol on wax esters synthesis by Novozyme 435 (A) (reaction condition: enzyme 1 U at 37°C and 200 rpm for 3 h) and crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 (B) (reaction condition: enzyme 40 U, at 30°C and 200 rpm for 9 h).

10.5 การศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

การศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ตรีงรูป Novozyme 435 ปริมาณ 1.0 ยูนิต ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมัน ต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:2 (โมล/โมล) (137.3 μmol /274.8 μmol) ในตัวทำละลายที่แตกต่างกัน คือ เอทิลอะซีเตท (log P= 0.68), คลอโรฟอร์ม (log P= 2.00), เฮกเซน (log P= 3.50), เฮปเทน (log P= 4.00) และ ไอโซออกเทน (log P=4.50) 1 มิลลิลิตร ความคุมปริมาณน้ำที่ 0.75 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ผลดัง Figure 26A พบว่า ชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อการทำปฏิกิริยาอย่างมาก ซึ่งค่า log P จะบ่งบอกถึงความชอบน้ำหรือความมีขี้ โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P น้อยกว่า 3 แสดงว่าเป็นไฮโดรฟิลิก และมากกว่า 3 เป็นไฮโดรโฟบิก เมื่อเติมคลอโรฟอร์มทำให้การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ลดลงเป็น 19.62 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 3 ชั่วโมง แต่ตัวอย่างที่ใช้เฮกเซนสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 87.85 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเฮกเซนเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Laane และคณะ (1987) และ Gunawan และคณะ (2005) พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ คือ เฮกเซน และตัวทำละลายอินทรีย์บางตัวอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเอนไซม์ โดยจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจน (Soumanou *et al.*, 2003) ส่วน Radzi และคณะ (2005) ศึกษาการสังเคราะห์โอลิอิล โอลิเอตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรีงรูปจาก *Candida rugosa* รายงานว่าข้อดีของการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ สามารถเพิ่มการละลายของสับสเตรทที่มีการละลายน้ำได้น้อย สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่า และตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ (log P>4) จะช่วยละลายสับสเตรทที่เป็นน้ำมันได้ดีและตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P>3.5 สามารถเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันได้ดีกว่า อีกทั้งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกรดอ่อนอาจจะเกิดการกระจายตัวของกรดอ่อนทำให้มีความเข้มข้นของโปรตอนและทำให้เกิดการชักจูงให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับ (hydrolysis) ได้

ส่วนการศึกษาชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 ปริมาณ 40 ยูนิต ทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันโดยใช้ไขมันปลาต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:2 (โมล/โมล) (137.3 μmol /274.8 μmol) ในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำเท่ากับ 0.75 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 26B พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ไอโซออกเทน ซึ่งสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ปริมาณสูงที่สุด 95.07 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และค่อนข้างคงที่ 95.55 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ

เฮกเซนและเฮปเทน ซึ่งเอนไซม์สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ใกล้เคียงกันได้สูงสุดที่ 93.74 เปอร์เซ็นต์ และ 91.01 เปอร์เซ็นต์ ส่วน MTBE และเอทิลอะซิเตต เอนไซม์สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 53.25 และ 39.71 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 9 ชั่วโมง และคลอโรฟอร์ม เอนไซม์สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้น้อยที่สุด 0 เปอร์เซ็นต์ และ 12.30 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าในไอโซออกเทน เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จากเอนไซม์ไลเปส *Burkholderia* sp. EQ3 ซึ่งสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 95.07 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 6 ชั่วโมง โดยปริมาณของไขมันปลาเหลือ 2.36 เปอร์เซ็นต์ ซีทิลแอลกอฮอล์ 2.57 เปอร์เซ็นต์ โดยการศึกษาของ Radzi และคณะ (2005) ทำการศึกษาการสังเคราะห์โอลิอีลโอลิเอตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antartica* พบว่าการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์จะมีปริมาณมากตามค่า $\log P$ ของตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งชุดการทดลองที่ใช้ n-hexadecane ($\log P = 8.8$) ให้การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์สูงสุด 93.2 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ โนเนน (nonane) ($\log P = 5.1$) และเฮกเซน ($\log P = 3.5$) ซึ่งสังเคราะห์ได้ 92.1 และ 91.8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ที่มีค่า $\log P < 3.5$ จะให้การสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ที่น้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P$ น้อย จะมีขี้วมมากกว่าและไปแย่งดึงน้ำบริเวณตัวพุงหรือเอนไซม์ส่งผลต่อรูปร่างให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดี Radzi และคณะ (2005) ศึกษาการสังเคราะห์โอลิอีลโอลิเอตโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปจาก *Candida antartica* รายงานว่าตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ว ($\log P > 4$) จะช่วยละลายสับสเตรทที่เป็นน้ำมันได้ดีและตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า $\log P > 4$ สามารถเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันได้ดีกว่า แต่ผลการทดลองครั้งนี้ไม่ได้เป็นไปตามค่า $\log P$ ทั้งนี้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไล่ไปเพื่อให้สับสเตรทก็คือไขมันปลาที่สกัดได้และซีทิลแอลกอฮอล์ซึ่งมีลักษณะเป็นของแข็งนั้นละลายได้ดี โดยทุกตัวทำละลายอินทรีย์สามารถละลายสับสเตรทได้ แต่สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงเมื่อใช้ตัวทำละลายที่มีค่า $\log P$ สูง ส่วนปฏิกิริยาในเอทิลอะซิเตตและ MTBE สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้น้อยกว่าทั้งนี้อาจเพราะตัวทำละลายที่มีขี้วจะไปดึงน้ำจำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาออกจากเอนไซม์ (Radzi *et al.*, 2005) อีกทั้งปฏิกิริยาในเอทิลอะซิเตตนั้นพบว่าเกิดผลิตภัณฑ์อีกอย่าง ซึ่งอาจจะอยู่ในกลุ่มของเอทิลเอสเทอร์ เนื่องจากเอทิลอะซิเตตประกอบด้วยเอทิลแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก

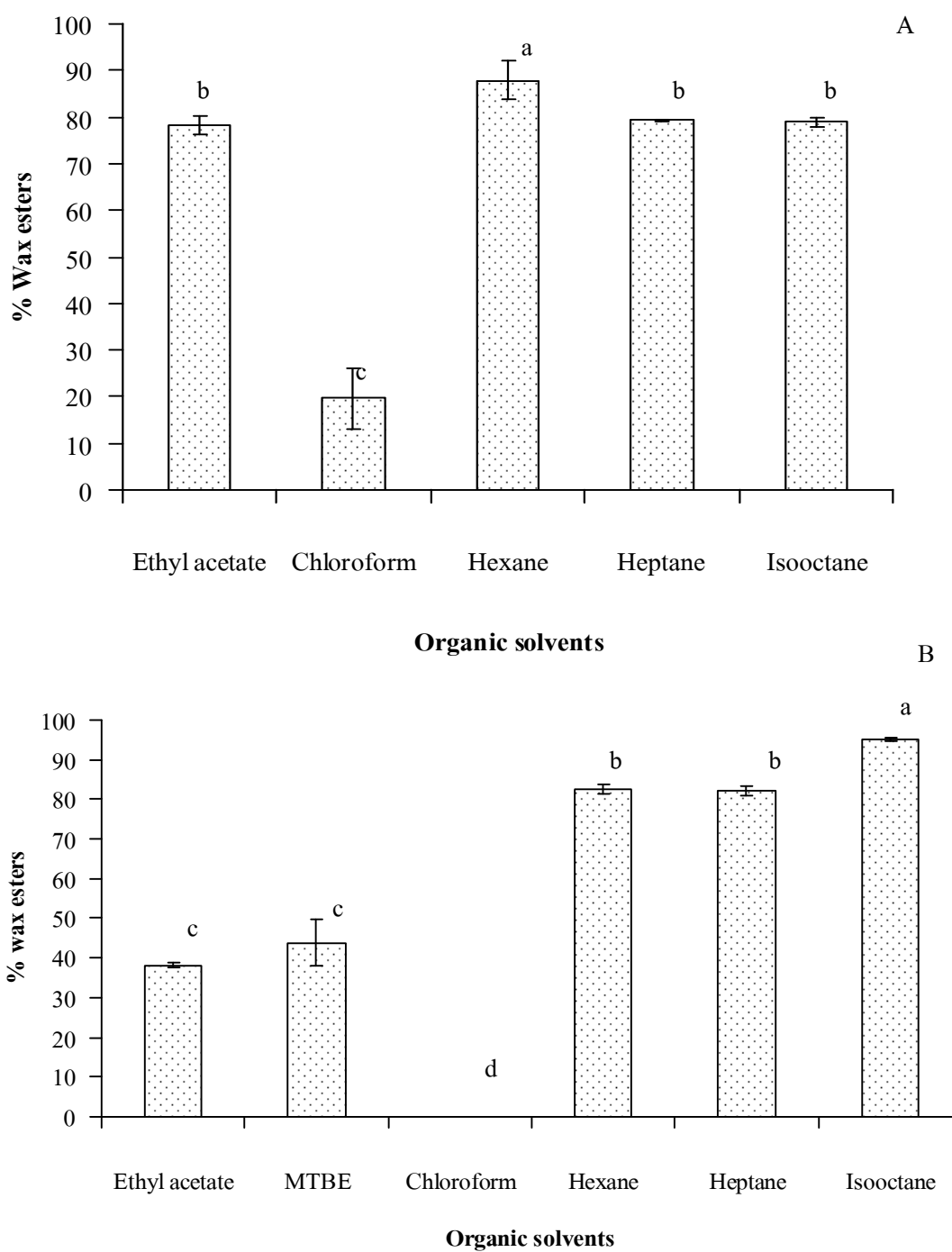


Figure 26. Effect of organic solvents on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake by Novozyme 435 (A) (reaction condition: enzyme 1 U, substrate molar ratio 1:2, at 37 °C and 200 rpm for 3 h) and crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3 (B) (reaction condition: enzyme 40 U, substrate molar ratio 1:2, at 30°C and 200 rpm for 6 h).

10.6 การศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

การศึกษาปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรังรูป Novozyme 435 ปริมาณ 1.0 ยูนิต ทำปฏิกิริยาโดยใช้ไขมันที่สกัดได้จากก้อนไขมันต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:2 (โมล/โมล) ($137.3 \mu\text{mol}/274.8 \mu\text{mol}$) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร ควบคุมปริมาณน้ำที่ 0.33, 0.67, 0.80 และ 0.90 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 0.33 ผลการทดลองดัง Figure 27. ซึ่งสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ 87.87 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังจาก 3 ชั่วโมงจะคงที่ และการควบคุมที่ปริมาณน้ำต่างๆ พบว่าสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้พบว่าการควบคุมปริมาณน้ำมีผลต่อการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ไม่มากนัก ส่วนผลของเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบพบว่าไม่สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้ เนื่องจากไม่มีความคงตัวเมื่อปรับควบคุมปริมาณน้ำเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากการทดลองผลสอดคล้องกับ Gunawan และคณะ (2004) ทำการทดลองปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 0.11-0.90 % พบว่าการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน Rahman และคณะ (2001) ศึกษาการสังเคราะห์ oleyl oleate โดย Lipozyme พบว่าค่าปริมาณน้ำที่เหมาะสม คือ 0.120 และปริมาณน้ำมากขึ้นการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ลดลงเนื่องจากเอนไซม์มีประสิทธิภาพลดลงและอาจเกิดปฏิกิริยาผันกลับได้

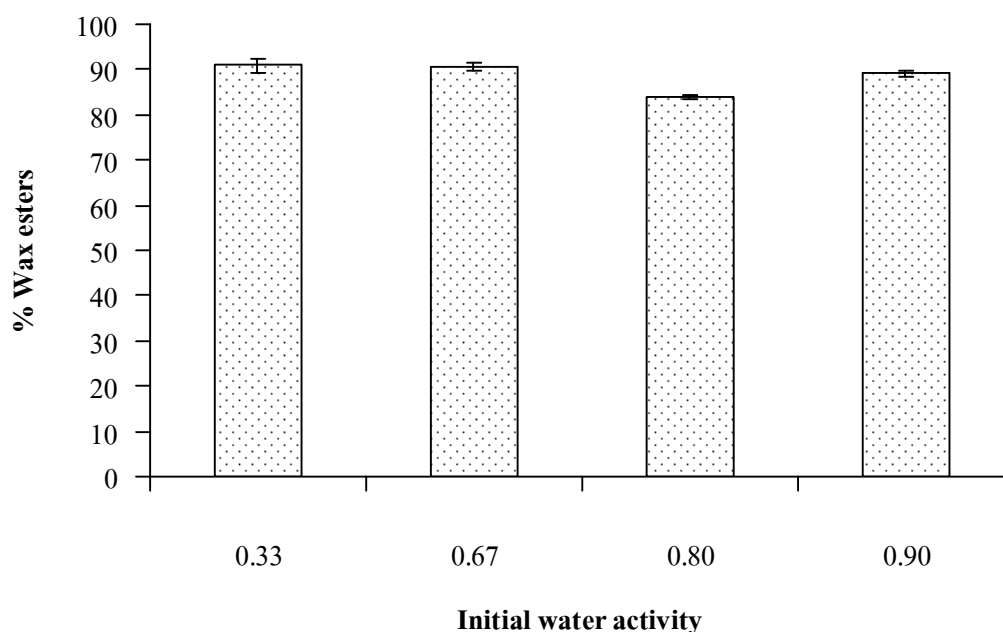


Figure 27. Effect of initial water activity (a_w) on wax esters synthesis from fat extracted from fat cake by Novozyme 435. (Reaction condition: enzyme 1 U, substrate molar ratio 1:2, 37°C and 200 rpm for 3 h).

บทที่ 4

บทสรุป

จากการศึกษาการสกัดไขมันด้วยเฮกเซนจากบ่อบำบัดน้ำเสียบ่อที่ 1 มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่มีสายคาร์บอนอะตอมตั้งแต่คาร์บอน 14 ถึง 18 คือ กรดไมริสติก 4.03 เปอร์เซ็นต์ กรดปาล์มิติก 47.39 เปอร์เซ็นต์ กรดสเตียริก 10 เปอร์เซ็นต์ กรดโอลิก 24.30 เปอร์เซ็นต์ และกรดลิโนเลอิก 9.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของไขมันเท่ากับ 839.12 กรัม/โมล มีแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์

การแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้อาหารแข็งพื้นฐานที่ประกอบด้วยน้ำมันปลาบริสุทธิ์ 1 เปอร์เซ็นต์ และ rhodamine B 0.001 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ได้ทั้งหมด 111 ไอโซเลท และเชื้อที่แยกได้สามารถเรืองแสงยูวีได้ 80 ไอโซเลท มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันไตรนิวไทรินเกิดวงใสรอบโคโลนีจำนวน 42 ไอโซเลท และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปลาบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลท EQ3 มีค่ากิจกรรมสูงสุด คือ 1.5 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท EQ3 มีลักษณะโคโลนีสีเหลือง กลม นูน ขอบเรียบ ทึบแสง มีขนาด 1-2 มิลลิเมตร ลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่งขนาดสั้น ย้อมแกรมลบ ขนาดเล็กมาก ไม่มีสปอร์ ทดสอบแคตาเลสให้ผลบวก พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท EQ3 มีความเหมือน *Burkholderia* sp. (identities) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ จึงให้ชื่อว่า *Burkholderia* sp. EQ3

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมโดยเลี้ยงแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. EQ3 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้สูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตได้ประมาณ 1.9 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร *Burkholderia* sp. EQ3 สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำมันปลา 1 เปอร์เซ็นต์ และทริปโตเนน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อสามารถใช้ในการเจริญได้ดี มีค่าจุดคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 3.4 และสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุดประมาณ 1.7 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์อย่างหยาบโดยการตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนต่างๆ พบว่าอะซิโตนเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสามารถตกตะกอนเอนไซม์ไลเปสได้ถึง 89 เปอร์เซ็นต์ ทำบริสุทธิ์ได้ 9.4 เท่า และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Burkholderia* sp. EQ3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 25 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอช

ปานกลางที่ 6.0-7.0 มีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และพีเอชต่างที่ 9.0-12.0 โดยให้กิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดเมื่อพีเอชเท่ากับ 10.0

Novozyme 435 สามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุด สภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน โดยใช้ไขมันปลาต่อซีทิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:2 (โมล/โมล) ในเฮกเซน 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ซึ่งสามารถผลิตแวกซ์ได้ 87.87 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 3 ชั่วโมง ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบจาก *Burkholderia* sp. EQ3 ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ คือ ปริมาณเอนไซม์ 40 หน่วย อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างไขมันปลากับซีทิลแอลกอฮอล์ 1:2 ละลายในไอโซออกเทน 1 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ในการทำปฏิกิริยา พบว่าเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบสามารถสังเคราะห์แวกซ์เอสเทอร์ได้สูงสุด 95.07 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 6 ชั่วโมง

Table 6. Comparisons of wax esters production by Novozyme 435 and crude lipase from *Burkholderia* sp. EQ3.

Factors	Crude lipase from <i>Burkholderia</i> sp. EQ3	Novozyme 435
1. Temperature (°C)	30 °C	37 °C
2. Enzyme concentration (U)	40	1
3. Molar ratio of fat and cetyl alcohol (mol/mol)	1:2	1:2
4. Organic solvent	Isooctane	Hexane
5. Yield of wax esters (%)	95.07	87.87
6. Time of production (h)	6	3

เอกสารอ้างอิง

- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2537. มาตรฐานน้ำทิ้งอุตสาหกรรมปลากระป๋อง (ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://www.diw.go.th/EMS%20for%20SMEs%20Website/page/page%2014.htm> (21 มีนาคม 2552).
- กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชรินทร์ เตชะพันธุ์. 2542. การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ณัฏฐภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. 2549. เอนไซม์ไลเปส: การผลิตและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย. ปีที่ 26. เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม.
- ปิโยรส หงษาชาติ, 2546. การใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงรูปในการเพิ่มกรดไอโคซะเพนทาอีโนอิกและกรดโดโคเฮกซะอีโนอิกจากน้ำมันปลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ปวีณา พงษ์คนตรี, 2547. โรงงานชีวภาพสำหรับผลิตกรดไขมันเพื่ออุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, 2538. การผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aeromonas sobria* สายพันธุ์ LP 004. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- พูนสุข ประเสริฐสรรพ. 2542. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 21-56.
- วิภูมิ แก้วทอง, 2539. การคัดเลือกและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชนิดต่าง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

- ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง. 2541. การแยกน้ำมันออกจากปิโตรเลียมแวกซ์. โครงการงานวิจัย. สาขาวิชาเคมีอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สาโรจน์ สิริสันสนียกุล และ ประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2538. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- อภัสรา ชมิดท์. 2537. ลิพิด. ใน *ชีวเคมี*. หน้า 187-217. กรุงเทพฯ: เค. ยู. เพลสส์.
- อรัญ หันพงษ์กิตติกุล, ทิพรรัตน์ หงษ์ทรีศรี และ ปิยะรัตน์ ธนโกเศศ. 2536. การเลี้ยงยีสต์ในน้ำนิ่ง ปลายทางหลังการแยกโปรตีนและไขมัน. รายงานโครงการวิจัย. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Abada, E. A. E. 2008. Production and characterization of a mesophile lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. *Pak. J. Biol. Sci.* 11:1100-1106.
- Achamma, T., Manoj, M. K., Valsa, A., Mohan, S. and Manjula, R. 2003. Optimization of growth condition for the production of extracellular lipase by *Bacillus mycoides*, *Indian J. Microbiol.* 43: 67-69.
- Akkara, J. A., Ayyagari, M. S. R. and Bruno, F. F. 1999. Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents. *Trends Biotechnol.* 17: 67-73.
- Alkan, H., Baysal, Z., Uyar, F. and Dogru, M. 2006. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 136:183-192.
- A. O. A. C. 1990. Official Method of Analysis. 15th ed. The Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia.
- A. O. A. C. 1995. Official Method of Analysis. 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Virginia.
- Aracil, J., Garcia, T. and Martinez, M. 1992. Enzymatic synthesis of an analogue of jojoba oil: optimization by statistical analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 607-611.

- Balcao, V. M., Paiva, A. L. and Malcata, X. F. 1996. Bioreactors with immobilized lipases: state of art. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 392–416.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S. E. and Kirk, O. 1991. The future of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9: 360-363.
- Bora, L. and Kalita, M. C. 2007. Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp LBN 4. *Internet J. Microbiol.* ISSN: 1937-8289.
- Bornscheuer, U. T. 1995. Lipase-catalyzed synthesis of monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 578–586.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:73–81.
- Bradoo, S., Rathi, P., Saxena, R. K. and Gupta, R. 2002. Microwaveassisted rapid characterization of lipase selectivities. *J. Biochem.* 51:115–120.
- Cappe, P., Mourey, A. and Kilbertus, G. 1994. Variation of lipolytic activity in the genus *Acinetobacter* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 4: 133-114.
- Chaiyaso, T. 2007. Synthesis of sugar esters and fatty acid methyl esters from palm oil and palm fatty acid distillates by two bacteria lipase. Ph. D. Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.
- Chen, J. P. 1996. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. *J. Ferment. Bioeng.* 82:404-407.
- Chen, J. P. and Wang, J. B. 1997. Wax ester synthesis by lipase-catalyzed esterification with fungal cells immobilized on cellulose biomass support particles. *Enzyme Microb. Technol.* 18:615-622.
- Chigusa, S., Hasegawa, T., Yamamoto, N. and Watanabe, Y. 1996. Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeasts. *Water Sci. Technol.* 34: 51-58.

- Christner, J., Pfeiderer, E. and Taeger, T. 1991. Enzyme-aided soaking process for skins and hides. United Kingdom Patent 2233665.
- Cordenons, A., Gonzalez, R., Kok, R., Hellingwerf, K. J. and Nudel, C. 1996. Effect of nitrogen sources on the regulation of extracellular lipase production in *Acinetobacter calcoaceticus* strains. *Biotechnol. Lett.* 18:633-638.
- Demoraes, J. and Chandan, R. C. 1982. Factors influencing the production and activity of a *Streptococcus thermophilus* lipase. *J. Food Sci.* 47: 1579–1583.
- Dharmsthiti, S. and Kuhasuntisuk, B. 1998. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21:75–80.
- Dharmsthiti, S. and Luchai, S. 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp.* THL 027. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 241–246.
- Dutta, S. and Ray, L. 2009. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142-154.
- Emanuilova, E., Kambourova, M., Dekosvka, M. and Manolov, R. 1993. Thermoalkalophilic lipase producing *Bacillus* selected by continuous cultivation. *FEMS Microbiol. Lett.* 108:247–250.
- Erbeldinger, M., Xiongwei, N. I. and Halling, P. J. 1998. Enzymatic synthesis with mainly undissolved substrates at very high concentrations. *Enzyme Microb. Technol.* 23: 141-148.
- Ertugrul, S., Donmeza, G., Takac, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus sp.* from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J. Hazard. Mater.* 149: 720–724.
- Espinosa, E., Sanchez, S. and Farres, A. 1990. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. *Biotechnol. Lett.* 12: 209-214.

- Fahim, F. A., Daisy H. F., Ibrahim A. M. and El-Dars F. M. S. 2001. Evaluation of some methods for fish canning wastewater treatment. *Water Air Soil Pollut.* 127: 205–226.
- Fajardo, A. R., Cerdán, L. E., Medina, A. R., Martínez, M. M. M., Pena, E. H. and Grima, E. M. 2006. Concentration of eicosapentaenoic acid by selective esterification using lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 215–221.
- Falony¹, G., Armas, J. C., Mendoza¹, J. C. D. and Hernandez, J. L. M. 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 44:235–240.
- Figurin, Y. V., Shestakova, I. S., Mironova, T. F., Shtein, I.V. and Arends, I. M. 1990. Method of processing hides and skins. Union of the Soviet Socialists Republic Patent 1567634.
- Fogarty, M. F. 1983. Protease. *In* Microbial enzymes and biotechnology. (Fogarty, M.F., ed.). p. 111–123. Applied Science Publishers. London.
- Freedman, B., Prydee, H. and Kwolek, W. F. 1984. Thin layer chromatography/flame ionization analysis of transesterified vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61:1215-1220.
- Frost, M. G. and Moss D. A. 1987. Production of enzymes by fermentation. *In* Biotechnology. Vol VII (Rehm, H. J. and Reed, G., eds). pp. 65-212. VCH Publishers. New York.
- Gandhi, N. N. 1997. Application of lipase. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 74: 621-634.
- Garcia, H. S., Yang, B. and Parkin, K. L. 1995. Continuous reactor for enzymatic glycerolysis of butter oil in the absence of solvent. *Food Res. Int.* 28:605-609.
- Ghanem E. H., Al-Sayed H. A. and Saleh K. M. 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 16:459-464.
- Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. and Davidson, W. S. 1996. Microbial lipases: production and applications. *Sci. Prog.* 79: 119-157.

- Gilbert, E. J., Cornish, A. and Jones, C. W. 1991. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF 2. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2223-2229.
- Godfrey, T. and Reichelt, J. 1983. Industrial Applications. *In Industrial Enzymology-Applications of Enzymes in Industry.* (Godfrey, T. and Reichelt, J., eds.) pp. 170–465. The Nature Press. London.
- Gulati, R., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. and Davidson, W. S. 1999. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochem.* 35: 459-461.
- Gunawan, E. R., Basri, M., Rahman, M. B. A., Salleh, A. B. and Rahman, R. N. A. 2004. Lipase-catalyzed synthesis of palm oil based wax esters. *J. Oleo Sci.* 10: 471-477.
- Gupta, N., Sahai, V. and Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochem.* 42 :518–526.
- Handelsman, T. and Shoham, Y. 1994. Production and characterization of the extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 40:435-443.
- Hatzinikolaou, D. G., Kourentzi, E., Stamatis, H., Christakopoulos, P., Kolisis, F. N., Kekos, D. and Macris, B. J. 1999. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cell: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *J. Biosci. Bioeng.* 88:53-56.
- Herbert, R. A. 1992. The perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends Biotechnol.* 10: 395–402.
- Herd, T. H., Mei, L., Credille, K. M., Kennis, R. A., Maier, R. L., Dziezyc, J., Tucker, K. A., Reinhart, G. A. and Davenport, G.M. The role of nutrition on canine sebum secretion: a preliminary report (ออนไลน์). สืบค้นจาก:

http://www.breedsmartpartners.com/bronline/en_US/jsp/BO_Page.jsp?pageID=RLDP&articleID=115. (18 ธันวาคม 2552).

- Hoil, A., Jonzo, M. D., Druet, D. and Comeau, L. 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme Microb. Technol.* 25:80-87.
- Hoil, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L. and Comeau, L. C. 2000. Purification and characterization of extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 26:421-430.
- Hoq, M. M., Yamane, T., Shimizu, S., Funada, T. and Ishida, S. 1985. Bioreactor for enzymatic reaction of fat and fatty acid derivatives III continuous hydrolysis of olive oil by lipase in a microporous hydrophobic membrane reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62:1016-1021.
- Hui, Y. H. 1996. Palm Oil. *In* Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Vol. II. (Hui, Y.H., ed.). pp. 271-376. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Iizumi, T., Nakamura, K. and Fukase, T. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* 54:1253-1258.
- Isono, Y., Nabetani, H. and Nakajima, M. 1995. Lipase-surfactant complex as catalyst of interesterification and esterification in organic media. *J. Ferment. Bioeng.* 80:170-175.
- IUPAC. 1979. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivative, 6th ed. Part I. Pergamon Press. France.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M. and Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 29-63.
- Jonzo, M. D., Hoil, A., Zagol, I., Druet, D., Comeau, L. C. 2000. Concentrates of DHA from fish oil by selective esterification of cholesterol by immobilized isoforms of lipase from *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 443-450.

- Joseph, B., Ramteke, P. W. and Kumar, P. A. 2006. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 52: 315–320.
- Kader, R., Yousuf, A. and Hoq, M. M. 2007. Optimization of lipase production by a *Rhizopus* MR12 in shake culture. J. Appl. Sci. 7: 855-860.
- Kaewsuwan, S., Cahoon, E. B., Perroud, P. F., Wiwat, C., Panvisavas, N., Quatrano, R. S., Cove, D. J. and Bunyapraphatsara, N. 2006. Identification and functional characterization of the moss *Physcomitrella patens* delta5-desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis. J. Biol. Chem. 21988-21997.
- Kaewthong, W. 2004. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. Ph. D. Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.
- Kamini, N. R., Fujii, T., Kurosu, T. and Iefuji, H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. Process Biochem. 36: 317-324.
- Kaur, J., Ramamurthy, V. and Kothari, R. M. 1993. Characterization of oat lipase for lipolysis of rice bran oil. Biotechnol. Lett. 15: 257-262.
- Kim, E. K., Song, M. H., Kim, H. M. and Oh, T. K. 1994. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 961-962.
- Kiran, S. G., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, S., Arunkumar, M., Thangavelu, T. and Natarajaseenivasan, K. 2008. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). Bioprocess Biosyst. Eng. 31:483–492.
- Kojima, Y. and Shimizu, S. 2003. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. J. Biosci. Bioeng. 96: 219-226.

- Kokusho, Y., Machida, H. and Iwasaki, S. 1982. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. strain No. 679. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1743-1750.
- Kristjansson, J. K. and Stetter, K. O. 1992. Thermophilic bacteria. *In* *Thermophilic Bacteria* (Kristjansson, J.K., eds). pp.1-18. CRC Press. Boca Raton.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S. and Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purif.* 41: 38–44.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C. 1987. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 30: 81–87.
- Labuschagne, R. B., Tonder A. and Litthauer, D. 1997. *Flavobacterium odoratum* lipase: Isolation and characterization. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 52-58.
- Lee, S. Y. and Rhee, J. S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 617-623.
- Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* 216: 155–160.
- Liu, W. H., Beppu, T. and Arima, K. 1973. Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agric. Biol. Chem.* 37: 157-163.
- Liu, S., Zhang, C., Hong, P. and Ji, H. 2007. Lipase-catalysed acylglycerol synthesis of glycerol and n -3 PUFA from tuna oil: optimization of process parameters. *Food Chem.* 103:1009–1015.
- Lotrakul, P. and Dharmsthiti, S. 1997. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. *J. Biotechnol.* 54:113–120.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. T. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:26275.
- Macrae, A. R., 1983. Extracellular microbial lipases. *In* *Microbial Enzymes and Technology* (Fogerty, W. M., ed.), pp. 225-250. Applied Science. London.
- Mahler, G. F., Kok, R. G., Cordenons, A., Hellingwerf, K. J. and Nudel, B. C. 2000. Effects of carbon sources on extracellular lipase production and lipA transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 25–30.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G. J. and Amundson, C. H. 1992. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 426-446.
- Mayordomo, I., Gil-Randez, F. and Prieto, J. A. 2000. Isolation purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 105–109.
- Minoguchi, M. and Muneyuki, T. 1989. Immobilization of lipase on polyacrylamide and its use in detergents. Japanese Patent 1285188.
- Muderhwa, J. M. and Ratanahenina, R. 1985. Purification and properties of lipids from *Candida deformans* (Zach) langeron and guerra. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62:1031-1036.
- Nahas, E. 1988. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth condition. *J. Gen. Microbiol.* 134:227-233.
- Nishio, T. and Kamimura, M. 1988. Ester synthesis by crude lipase preparation from *Pseudomonas fragi* 22.39 B in n-Hexane. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2933-2935.
- Nishioka, M., Joko, K. and Takama, M. 1990. Lipase manufacture with *Candida* sp. for use in detergents. Japanese Patent 292281.
- Odera, M., Takeuchi, K. and Tohe, A. 1986. Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Ferment. Technol.* 64:363–371.

- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M. and Ishikawa, H. 2000. Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 451-457.
- Omar, I. C., Nishio, N. and Nagai, S. 1987. Production of thermostable lipase by *Humicola languinosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agric. Biol. Chem.* 51: 2145–2151.
- Onishi, K., Yoshida, Y. and Sekigushi, J. 1994. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* 77:490-495.
- Pawongrat, R. 2007. Enzymatic synthesis of polyunsaturated fatty acids rich fish oil. Ph. D. Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.
- Pawongrat, R., Xu, X. and H-Kittikun, A. 2007. Synthesis of monoacylglycerol rich in polyunsaturated fatty acids from tuna oil with immobilized lipase AK. *Food Chem.* 104: 251–258.
- Peter, T. R. and Robert, B. 2001. Beeswax through the ages. *Personal Care.* 10: 27–31.
- Petersson, A. E. V., Gustafsson, L. M., Nordblad, M., Borjesson, P., Mattiasson, B. and Adlercreutz, P. 2005. Wax esters produced by solvent-free energy-efficient enzymatic synthesis and their applicability as wood coatings. *Green Chem.* 7: 837-843.
- Petroleum wax overview. 2009. The International Group, Inc (ออนไลน์). สืบค้นจาก: <http://igiwax.com/wax-basics/overview/> (9 พฤศจิกายน 2552).
- Poisson, L., Jan, S., Vuilleumard, J. C., Sarazin, C., Seguin, J. P., Barbotin, J. N. and Ergon, F. J. 1999. Lipase-catalyzed synthesis of waxes from milk fat and oleyl alcohol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76:1017-1021.
- Posorske, L. H. 1984. Industrial scale application of enzymes to the fat and oil industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1758–1760.

- Prasertsan, P. and Choojit, W. 1988. Problem and solution of the occurrence of red colour in wastewater of seafood processing plant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 10:439-446.
- Radzi, S. M., Basri, M., Salleh, A. B., Ariff, A., Mohammad, R., Rahman, M. B. A. and Rahman, R. N. Z. R. A. 2005. Large scale production of liquid wax ester by immobilized lipase. *J. Oleo Sci.* 54: 4.
- Radzi, S. M., Basri, M., Salleh, A. B., Ariff, A., Mohammad, R., Rahman, M. B. A. and Rahman, R. N. Z. R. A. 2005. High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilized lipase from *Candida antartica*. *Electron. J. Biotechnol.* ISSN: 0717-3458.
- Rahman, M. B. A., Yong, K. C., Basri, M., Rahman, R. N. Z. 2001. Synthesis of oleyl oleate, a liquid wax ester, using lipozyme. *Malaysian J. Chem.* 3:10046-10050.
- Rapp, P. and Backhaus, S. 1992. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 938-943.
- Rathi, P., Bradoo, S., Saxena, P. K. and Gupta, R. 2000. A hyperthermostable alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. *Biotechnol. Lett.* 22: 495-498.
- Rehm, H. J. and Reed, G. 1984. *Biotechnology*. Vol I. pp. 157-158. Verlag Chemic, Weinheim.
- Robert, V. 1997. Interfacial activation of lipase facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15: 32-38.
- Roenne, T. H., Xu, X., and Tan, T. 2005. Lipase-catalyzed esterification of lactic acid with straight-chain alcohols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82:881-885.
- Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y. and Yamane, T. 1997. Repeated use of immobilized lipase for monoacylglycerol production by solid-phase glycerolysis of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74: 445-450.
- Rosu, R., Iwasaki, Y., Shimidzu, N., Doisaki, N. and Yamane, T. 1998. Enzymatic synthesis of glycerides from DHA-enriched PUFA ethyl ester by glycerolysis under vacuum. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 4: 191-198.

- Ruchi, G., Anshu, G. and Khare, S. K. 2008. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. *Bioresour. Technol.* 99: 4796–4802.
- Salis, A., Solinas, V. and Monduzzi, M. 2003. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 21:167–174.
- Sarabok, A. 2000. Enrichment of Ω -3 polyunsaturated fatty acids in tuna oils by two step enzymatic reactions with tree lipase. M. Sc. Thesis. Prince of Songkla University.
- Sari, A. and Karaipekli, A. 2008. Preparation and thermal properties of capric acid/palmitic acid eutectic mixture as a phase change energy storage material. *Mater. Lett.* 62: 903–906.
- Savolainen, M., Herder, J., Khoo, C., Lovqvist, K., Dahlqvist, C., Glad, H. and Juppo, A. M. 2003. Evaluation of polar lipid–hydrophilic polymer microparticles. *Int. J. Pharm.* 262: 47–62.
- Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S. and Gulati, R. 1999. Potential biocatalysis and future industry. *Curr. Sci. India.* 77: 110-115.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H. and Schmid, R. D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1214:43-53.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H. and Schmid, R. D. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochem. Biophys. Acta.* 1301: 105–114.
- Schmidt-Dannert, C., Luisa, R. M. and Schmid, R. D. 1997. Two novel lipases from the thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: Screening, purification, cloning, overexpression and properties. *Methods Enzymol.* 284:194–219.

- Schmid, R. D. 1987. Biotechnology: application to oleochemistry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64:563–570.
- Seitz, E. W. 1974. Industrial applications of microbial lipase: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51:12-16.
- Shahani, K. M. 1975. Lipases and esterases. *In Enzymes in Food Processing* (Reed, G., ed.). pp. 181–217. Academic Press. New York.
- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Jooly, R. S., Gupta, J. K. and Gupta, L. K. 2002. Production of extracellular lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Indian J. Microbiol.* 42: 49-54.
- Sheeler, P. and Bianchi, D. E. 1987. Cell metabolism. *In cell and molecular biology*. 3rd ed. (Sheeler, P. and Bianchi, D. E., ed.). pp. 213-282. John Wiley and Sons. Inc. New York.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Yodono, S., Nagao, T., Maruyama, K., Nakano, H., Komemushi, S. and Tominaga, Y. 1997. Enrichment of ethyl docosaheptaenoate by selective alcoholysis with immobilized *Rhizopus delemar* lipase. *J. Ferment. Bioeng.* 84:138-143.
- Shu, C. H., Xu, C. J. and Lin, G. C. 2006. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.* 41:734–738.
- Sin, K. P., Basri, M., Rahman, M. B. A., Salleh, A. B., Zaliha, R. N. Z. A. And Ariff, A. 2005. Optimization of palm-based wax esters production using statistical experimental designs. *J. Oleo Sci.* 54:519-528.
- Sonnet, P. E. 1988. Lipase selectivities. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65:900-904.
- Soumanou, M. M. and Bornscheuer, U. T. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 97–103.
- Stuer, W., Jaeger, K. E. and Winkler, U. K. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 168: 1070–1074.

- Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J. Biochem.* 109: 211–216.
- Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. and Tominaga, Y. 1992. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. *J. Biochem.* 112:598–603.
- Tufvesson, P. 2008. Lipase catalysed synthesis of speciality chemicals. Ph. D. Thesis in Biotechnology. Lund University.
- Turki, S., Kraeim, I. B., Weeckers, F., Thonart, P. and Kallel, H. 2009. Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresour. Technol.* 100: 2724–2731.
- Utsugi, A., Kanda, A. And Hara, S. 2009. Lipase specificity in the transacylation of triacylglycerin. *J. Oleo Sci.* 58:123-132.
- Wakelin, N. G. and Forster C. F. 1997. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresour. Technol.* 59: 37-43.
- Wang, Y. J., Sheu, J. Y., Wang, F. F. and Shaw, J. F. 1988. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. *Biotechnol. Bioeng.* 31:628-633.
- Wang, S. L., Lin, Y. T., Liang, T. W., Chio, S. H., Ming, L. J. and Wu, P. C. 2009. Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* TKU009 by the use of soybeans as the substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:65–73.
- Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y. and Yamada, K. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing micrororganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* 41: 1353-1358.
- Wong, D. W. S. 1995. Structures and mechanism. *In Food Enzymes.* (Wong, D. M. S., ed.). pp. 170-200. Chapman and Hall. New York.

- Wongsakul, S., Prasertsan, P., Bornscheuer, U. T., and H-Kittikun, A. 2004. Synthesis of 2-monoglycerides by alcoholysis of palm oil and tuna oil using immobilized lipases. *Eur J. Lipid Sci. Technol.* 105: 68-73.
- Yadav, D. G., Dhoot, S. B. 2008. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* Doi:10.1016/j.molcatb.2008.06.013.
- Yamamoto, K. and Fujiwara, N. 1988. Purification and some properties of a castor oil hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* 52:3015–3021.
- Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipids industry: engineering overview. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64:1657-1661.
- Yasuda, M., Ogino, H., Kiguchi, T., Kotani, T., Takakura, S., Ishibashi, T., Nakashima, T., Fukuda, H. and Ishihawa, H. 1999. Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cells. *J. Biosci. Bioeng.* 88:571-573.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Basal medium) (ดัดแปลงจาก Chaiyaso, T., 2007)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริปโตน	1.0	กรัม
ยีสต์สกัด	1.0	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	2.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
CaCl ₂	0.15	กรัม
น้ำมันปลาบริสุทธิ์	10.0	กรัม

ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 (ในกรณีอาหารแข็งจะเติมผงวุ้นในอัตราร้อยละ 1.5 ลงในอาหารพื้นฐาน)

2. การทำบริสุทธิ์น้ำมันที่สกัดได้ด้วย silica gel column chromatography

2.1 การเตรียมซิลิกาเจล

ซึ่งซิลิกาเจลตามปริมาณที่คำนวณได้จากปริมาณตัวอย่างที่จะใช้ในการผ่านคอลัมน์ตามสูตร (1) นำเจลที่ซึ่งเรียบร้อยแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้น Deactivate โดยการเติมน้ำกลั่นลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ กวนผสมอย่างรวดเร็ว เมื่อแห้งแล้วนำไปทำให้เย็นโดยใส่ในโถแช่เคเตอร์ 1 คืน หลังจากนั้นเก็บเจลใส่ขวดได้

$$\text{สูตร ปริมาณตัวอย่าง} \times 50 = \text{ปริมาณเจลที่ใช้} \dots\dots\dots (1)$$

$$0.1 \text{ (มล.)} \times 50 = 5 \text{ กรัม}$$

2.2 ขั้นตอนการบรรจุซิลิกาเจล

2.2.1. อุดปลายคอลัมน์ด้วยสำลีบางๆ ไม่แน่นไม่หลวมเกินไป

2.2.2. โรยผงซิลิกาเจลลงไปสูงประมาณ 0.5 เซนติเมตร

2.2.3. ผสมเจลด้วย solvent ที่จะใช้ชะตัวอย่างพอประมาณแล้วใส่ magnetic stirrer วางบน hot plate ไม่เปิดอุณหภูมิและกวนตลอดเวลา

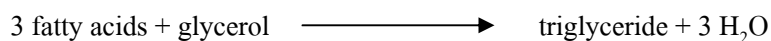
2.2.4. ใช้ปิเปตแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดเจลใส่ในคอลัมน์ด้านข้างโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศ

- 2.2.5 กวนบริเวณผิวหน้าของเจลที่ใส่ลงไปให้ฟุ้งเพื่อให้เกิดการเรียงตัวของเม็ดเจล
- 2.2.6 เมื่อใส่ครบตามปริมาณควรใส่ solvent ให้เลยชั้นของเจล 2-3 เซนติเมตร
- 2.2.7 ปิดฝาครอบตรงส่วนบนของคอลัมน์หรืออาจจะใช้สำลีเพื่อป้องกันการระเหยของ solvent

2.3 ขั้นตอนการทำปริศนารูปตัวอย่างด้วย silica gel column chromatography

- 2.3.1 นำตัวอย่างน้ำมันเข้มข้นในเฮกเซนอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงในคอลัมน์ที่บรรจุซิลิกาเจล ๖๖ ตัวอย่างออกมาด้วยตัวทำละลาย 4 ระบบ คือ
- ระบบที่ 1 คือ เฮกเซน: ไดเอทิลอีเทอร์: กรดอะซิติก อัตราส่วน 60:40:1
- ระบบที่ 2 คือ ไดเอทิลอีเทอร์: กรดอะซิติก อัตราส่วน 40:1
- ระบบที่ 3 คือ ไดเอทิลอีเทอร์: กรดอะซิติก อัตราส่วน 4:1
- ระบบที่ 4 คือ เมทานอล
- 2.3.2 เก็บตัวอย่างในแต่ละหลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร ระเหยตัวทำละลายที่อยู่ในหลอดของแต่ละตัวอย่างในตู้ควันจนแห้ง เช็คว่าความบริสุทธิ์ด้วย TLC/FID นำแต่ละตัวอย่างส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต่อไป

3. การหาน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (Salis *et al.*, 2003)



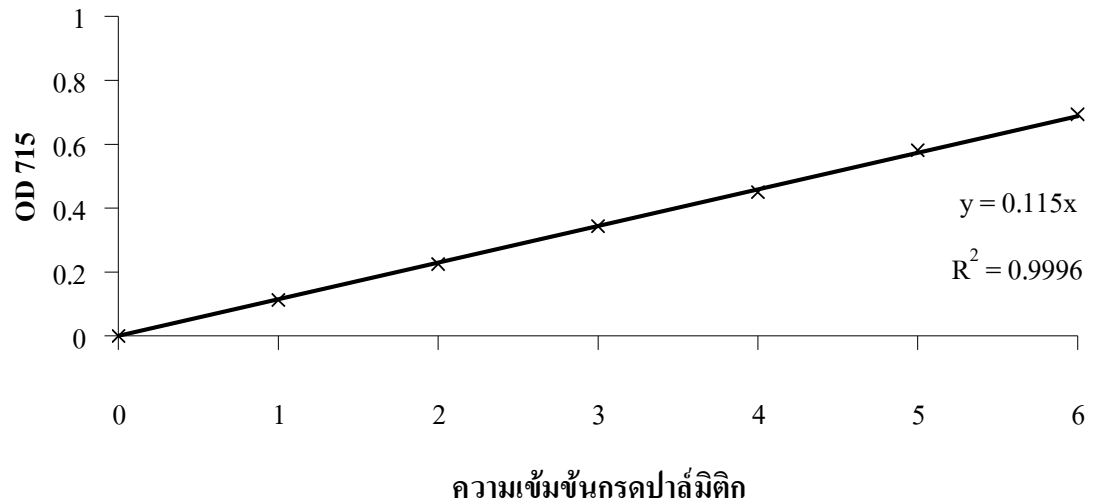
$$\text{ave. MW triglyceride} = 3 \cdot [\text{ave. MW fatty acids}] + [\text{MW (C}_3\text{H}_8\text{O}_3) - 3 * \text{MW (H}_2\text{O)}]$$

$$\text{ave. MW fatty acid} = \frac{(\% \text{ FA}_1) * (\text{MW FA}_1) + (\% \text{ FA}_2) * (\text{MW FA}_2) + \dots + (\% \text{ FA}_x) * (\text{MW FA}_x)}{100\%}$$

หมายเหตุ FA_x = กรดไขมันแต่ละชนิดที่มีอยู่ในตัวอย่าง

ภาคผนวก ข

1. กราฟมาตรฐานของกรดปาล์มิติกจากการหากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

Figure 27. Standard curve of palmitic acid ($\mu\text{g/ml}$)

2. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method

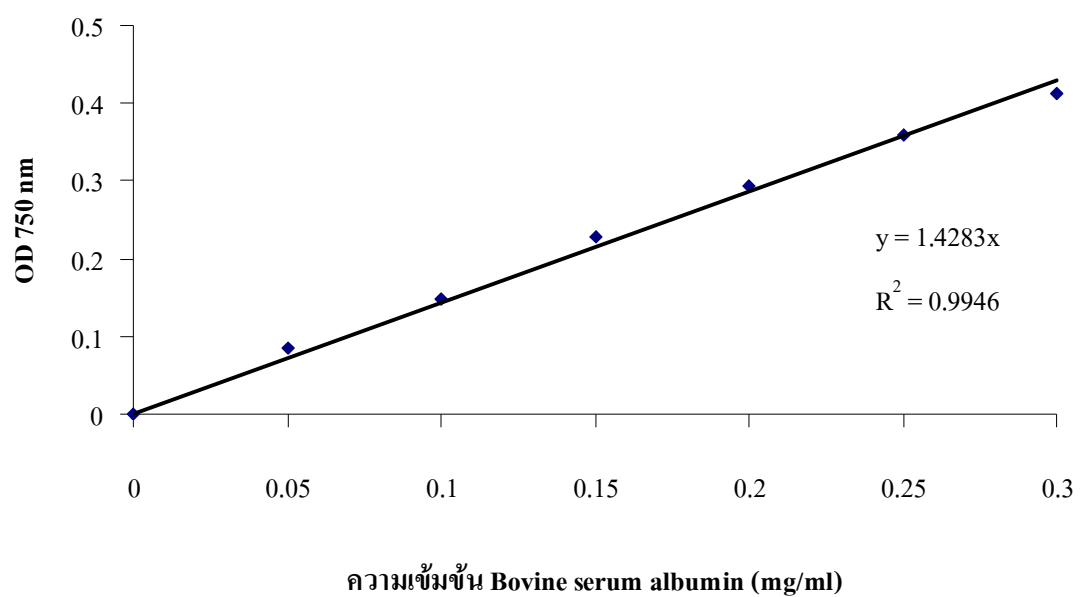
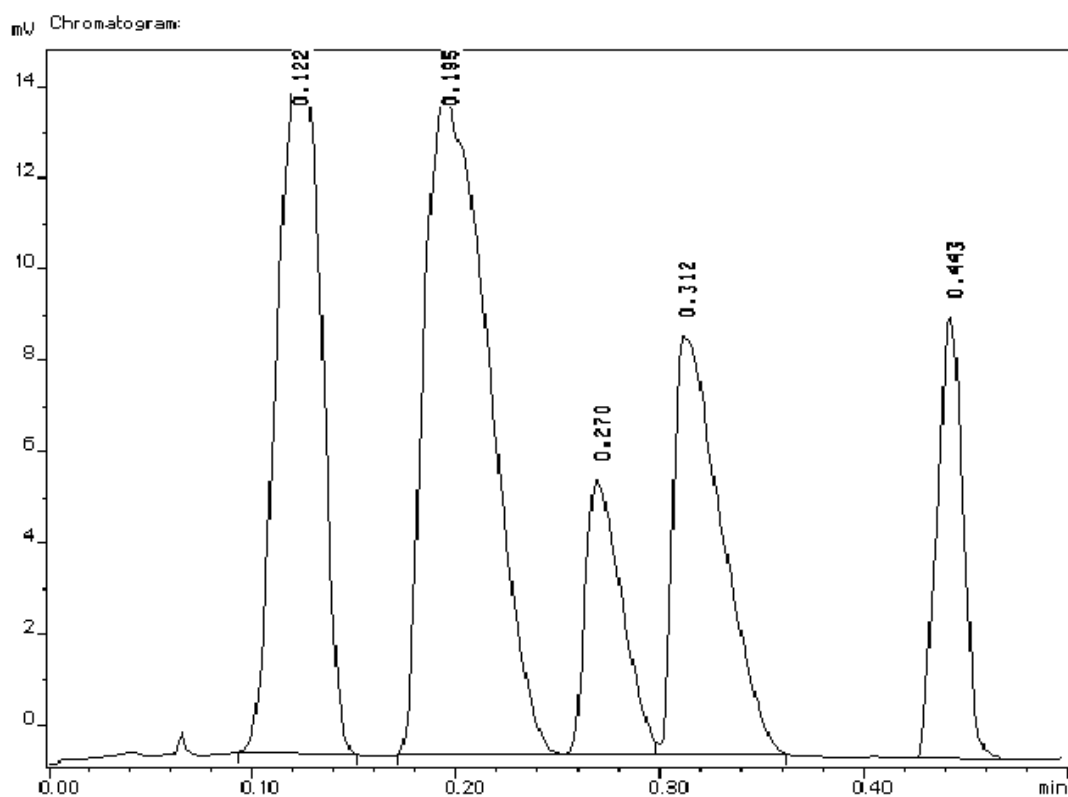


Figure 28. Standard curve of bovine serum albumin (mg/ml)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของไขมันด้วย TLC-FID



Peak No	Name	Ret. Time (min)	Pk. Start (min)	Pk. End (min)	Area	Height (mV)	Area %
1	Triolein	0.123	0.093	0.152	12059	15.26	26.731
2	Oleic acid	0.195	0.172	0.248	16658	14.41	36.923
3	1,3-Diolein	0.270	0.248	0.298	3913	5.99	8.674
4	1,2-Dioleoyl-rac-glycerol	0.313	0.298	0.362	7831	9.07	17.358
5	Monopalmitin	0.443	0.427	0.472	4654	9.67	10.315
					45115	54.39	100.00

condition: Stationary phase : CHROMAROD-S III

Mobile phase : Benzene/chloroform/acetic acid (50:20:0.7) for 35 min

Gas flow : H₂ 150 ml/min, air 700 ml/min

Scanning speed : 30 sec/Rods

Table 7. Temperature and pH value of samples.

Sample	No.	Area	Temp. (°C)	pH
Soil	1	Grease trap pond (top)	28-30	4.14
	2	Grease trap pond (right-side)	„	5.46
	3	Grease trap pond (front)	„	4.40
	4	Grease trap pond (beside the pipe)	„	5.24
	5	Grease trap pond (right-front)	„	5.07
	6	Grease trap pond (center)	„	7.39
	7	Grease trap pond (left-front)	„	6.92
	8	Grease trap pond (left-front)	„	7.43
	9	Grease trap pond (right-center)	„	6.81
	10	Grease trap pond (left-center)	„	6.99
wastewater	11	Grease trap pond (front)	„	6.87
	12	Grease trap pond (right-side)	„	6.81
	13	Grease trap tank	„	5.38
	14	Grease trap tank	„	5.84
	15	Drainage ditch 1	„	7.02
	16	Drainage ditch 2	„	6.99
	17	Equalization pond	„	6.71
	18	Equalization pond	„	6.74
	19	Cesspit 1	„	6.89
	20	Cesspit 2	„	6.90

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ (IUPAC, 1979)

อุปกรณ์

1. ขวดแก้วรูปชมพู่
2. กระบอกตวง
3. บิวเรต

สารเคมี

1. เอทิลแอลกอฮอล์ เข้มข้นร้อยละ 95
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (สารละลายในเอทิลแอลกอฮอล์) ที่มีความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
3. ฟีนอล์ฟทาลีน เข้มข้นร้อยละ 1 (ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-10 กรัม ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เตรียมสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกลาง โดยการเติมฟีนอล์ฟทาลีน 5 หยดและปรับให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล หยดต่างที่หยดพร้อมทั้งเขย่าหรือกวนจนได้สารละลายแอลกอฮอล์เป็นสีชมพูถาวร
3. เติมเอทิลแอลกอฮอล์ที่เป็นกลาง 50 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง เขย่าอย่างแรงให้ตัวอย่างละลายในแอลกอฮอล์ถ้าละลายได้ไม่ดีให้อุ่นที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส
4. ไทเทรตสารละลายตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ขณะไทเทรตต้องเขย่าอย่างแรงจนกระทั่งได้สารละลายสีชมพูคงที่ 1 นาที
5. คำนวณค่ากรดและปริมาณกรดไขมันอิสระจากสูตร

การคำนวณ

กรดไขมันอิสระ (คิดเป็นร้อยละในรูปกรดโอเลอิก)

$$= \frac{\text{ปริมาตรค่าที่ใช้ (มล.)} \times \text{ความเข้มข้นค่าที่ใช้ (มล.)} \times 28.2}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

(น้ำหนักโมเลกุลของกรดโอเลอิกเท่ากับ 28.2)

2. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (A O A C, 1990)

อุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
3. ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
4. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
5. ชุดย่อยโปรตีน ประกอบด้วย เตาช้อน (heater) และเครื่องจับไอกรด (scrubber)
6. ชุดกลั่นโปรตีน Kjeldahl system distilling unit

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) อัตราส่วน 1:10
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 20 และ ร้อยละ 60 (โดยน้ำหนัก)
4. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 (โดยน้ำหนัก)
5. สารละลายกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.1 (โดยปริมาตร)
6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทิลเรด เมทิลบลู และ โบโร โมครีซอลกรีน

วิธีการ

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่าง (ของแข็ง) ให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1.0 กรัม (ตัวอย่างของเหลวใช้ ปริมาตร 1-10 มิลลิลิตร) ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน ทำแบลิ่งค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยในเตาช้อน แล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ค้างที่มีสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 500-600 มิลลิลิตร และเครื่องจับไอกรดให้ เรียบร้อย
5. เปิดเครื่องจับไอกรดและเตาช้อน แล้วตั้งอุณหภูมิเป็น 350 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ย่อยจนได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่น

1. เปิดสวิตช์ชุดกลั่นโปรตีน และนำหล่อเย็น
2. กลั่นล้างเครื่องด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
3. นำขวดย่อยโปรตีนต่อเข้ากับชุดกลั่นโปรตีน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
4. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีการเติมกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และอินดิเคเตอร์ ไปรองรับของเหลวที่จะกลั่นออกมาโดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควมแน่นจุ่มลงในสารละลาย
5. กลั่นโดยใช้เวลาประมาณ 4 นาที
6. ไตรเทรทสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.1 สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (g/ml)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007}{W}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (g/ml)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007 \times F}{W}$$

โดยที่

a = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไทเทรตกับแบล็งก์ (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักหรือปริมาตรตัวอย่างเริ่มต้น (ลิตร)

F = แฟกเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสำหรับอาหารชนิดต่างๆ

(แฟกเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสำหรับผลิตภัณฑ์จากปลาเท่ากับ 6.25)

3. ปริมาณความชื้น (A O A C, 1990)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (moisture can)

4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบภานะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ถึงไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเท่ากับ อุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-2 กรัม ใสลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ถึงไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงเท่ากับ อุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง
4. อบซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

4. การหาปริมาณเกลือ (A O A C, 1995)

อุปกรณ์

1. เตาไฟฟ้า
2. เครื่องหมุนแบบแม่เหล็ก (magnetic stirrer) และแท่งแม่เหล็ก
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
5. ปิเปต ขนาด 5 มิลลิลิตร
6. บิวเรต ขนาด 25 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. กรดไนตริกเข้มข้น

3. สารละลายแอมโมเนียมไซโอไซยานตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
4. สารละลายแอมโมเนียมฟิวริกซัลเฟตอิ่มตัว

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่างน้ำเสีกลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 0.1 มิลลิลิตร
2. ปิเปตสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงไปผสม
3. เติมกรดไนตริกเข้มข้นจำนวน 20 มิลลิลิตร
4. ตั้งบนเตาไฟฟ้า คัมให้เดือดอ่อนๆ นานประมาณ 15 นาทียกกลงตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
5. เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
6. เติมสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ฟิวริกซัลเฟตอิ่มตัว 5 มิลลิลิตร
5. ไตเตรตกับสารละลายแอมโมเนียมไซโอไซยานตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งได้สารละลายสีแดงอ่อน

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเกลือ (ร้อยละ)} = [(a \times N_1) - (b \times N_2)] \times 58.44$$

โดยที่

- a = ปริมาตรของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตที่ใช้
- b = ปริมาตรของสารละลายแอมโมเนียมไซโอไซยานตที่ใช้
- N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต
- N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมไซโอไซยานต

5. การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดปาล์มิติก

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

สารละลาย cupric acetate-pyridine reagent เตรียมโดยชั่ง cupric acetate ($C_4H_6CuO_4 \cdot H_2O$) 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 850 มิลลิลิตร กรองส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.1 โดยใช้ไพริดีน (pyridine) และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งกรดปาล์มดิกที่มีความบริสุทธิ์สูง 0.2564 กรัม ละลายในไอโซออกเทน อาจแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อช่วยในการละลาย เมื่อละลายหมดปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร (จะได้สารละลายกรดปาล์มดิกเข้มข้นเท่ากับ 10 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)
2. นำสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1 ปริมาตร 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 และ 0.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยไอโซออกเทนให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลาย cupric acetate-pyridine reagent ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและทิ้งให้แยกชั้น
4. ดูดสารละลายชั้นบนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 715 นาโนเมตร โดยใช้ไอโซออกเทนเป็นแบล็ก
5. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดปาล์มดิก ดังแสดงในภาคผนวก ข

6. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลาย A: 2% โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย B: 0.5% คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ใน 0.1% โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassiumtartrate)
3. สารละลาย C: ผสมระหว่างสารละลาย A และ B ปริมาตร 50 และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ
4. สารละลาย D: เจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย C ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
2. เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
3. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมตัวอย่างเป็นแบล็ก โดยทำตามขั้นตอน 1-4
5. คำนวณปริมาณโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

6. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0.05-0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำตามขั้นตอนข้อ 1-4 โดยใช้สารละลายโปรตีนแทนสารตัวอย่าง
7. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน BSA ดังแสดงในภาคผนวก ข

ภาคผนวก ง

1. การวิเคราะห์ลำดับเบสของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Burkholderia* sp. EQ3 1500 คู่เบส

GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGAT
AGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATAACGATCTACGGATGAAAGCGGGGGACC
TTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG
GCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGC
GAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCAC
TTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTGGCTCTAATACAGCCGGGGGATGACGGTACCGGAA
GAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGA
AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAG
AGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCG
ATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGG
GGATTCATTTCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGG
TCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGT
GGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCCG
CTGAGAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT
CAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTA
GTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATAACAATGGT
CGGAACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGTA
GTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACACCGCCCGTCACACCAT
GGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGG
TAGGATTCATGACTGGGGTGAAGTCTAAACCAAGGGTAACA

Primer 's name : UFUL,350F,515F,785F,1099F

Program BLASTN 2.2.20+ Description
 All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS,
 GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Query Length 1414

Sequences producing significant alignments:

<u>Accession</u>	<u>Description</u>	<u>Max</u> <u>score</u>	<u>Total</u> <u>score</u>	<u>Query</u> <u>coverage</u>	<u>E</u> <u>value</u>	<u>Max</u> <u>ident</u>
	<i>Burkholderia</i> sp. 2xiao7 16S					
<u>FJ606689.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2577</u>	2577	99%	0.0	99%
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> strain					
<u>FJ436055.1</u>	SYe-6586 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2577</u>	2577	99%	0.0	99%
	<i>Burkholderia cepacia</i> strain yb90					
<u>EU214612.1</u>	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2577</u>	2577	99%	0.0	99%
	<i>Burkholderia cepacia</i> strain RRE5					
<u>AY946011.1</u>	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2577</u>	2577	99%	0.0	99%
	<i>Burkholderia cepacia</i> strain RRE3					
<u>AY946010.1</u>	16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2577</u>	2577	99%	0.0	99%
	<i>Burkholderia anthina</i> partial 16S rRNA gene, strain BHS1					
<u>AJ544072.1</u>		<u>2577</u>	2577	99%	0.0	99%
	<i>Burkholderia</i> sp. SYBC LIP-Y 16S					
<u>FJ392830.1</u>	ribosomal RNA gene, partial sequence	<u>2575</u>	2575	99%	0.0	99%
	<i>Burkholderia cepacia</i> isolate LMG					
<u>AF311970.1</u>		<u>2575</u>	2575	99%	0.0	99%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	12614 16S ribosomal RNA gene, partial sequence <i>Burkholderia cepacia</i> strain LMG					
AF097532.1	12614t2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2575	2575	99%	0.0	99%
AB480713.1	<i>Burkholderia</i> sp. T-34 gene for 16S rRNA, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%
AM747721.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 chromosome 2, complete genome	2571	2571	99%	0.0	99%
AM747720.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 chromosome 1, complete genome	2571	1.028e+04	99%	0.0	99%
EU684748.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> strain ZYB002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%
EU305400.1	<i>Burkholderia cepacia</i> strain PSB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%
AM905038.1	<i>Burkholderia lata</i> 16S rRNA gene, strain R-15816	2571	2571	99%	0.0	99%
AB252073.1	<i>Burkholderia cepacia</i> gene for 16S rRNA, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%
AB212235.1	<i>Burkholderia</i> sp. T201 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2571	2571	99%	0.0	99%
CP000152.1	<i>Burkholderia</i> sp. 383 chromosome 2, complete sequence	2571	2571	99%	0.0	99%
CP000151.1	<i>Burkholderia</i> sp. 383 chromosome 1, complete sequence	2571	1.023e+04	99%	0.0	99%

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
	complete sequence <i>Burkholderia cepacia</i> strain ATCC					
AY741360.1	700070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence <i>Burkholderia cepacia</i> strain ATCC	2571	2571	99%	0.0	99%
AY741349.1	49709 16S ribosomal RNA gene, partial sequence <i>Burkholderia cepacia</i> strain ATCC	2571	2571	99%	0.0	99%
AY741334.1	17759 16S ribosomal RNA gene, partial sequence <i>Burkholderia cepacia</i> genomovar III	2571	2571	99%	0.0	99%
AF265235.1	16S ribosomal RNA gene, partial sequence <i>Burkholderia</i> sp. KBC-3 16S	2571	2571	99%	0.0	99%
AY769904.1	ribosomal RNA gene, partial sequence <i>Burkholderia anthina</i> partial 16S	2571	2571	99%	0.0	99%
AJ420880.1	rRNA gene, strain R-4183	2571	2571	99%	0.0	99%
CP000378.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 chromosome 1, complete sequence	2567	1.024e+04	99%	0.0	99%

> [gb|FJ606689.1|](#) Burkholderia sp. 2xiao7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1520

Score = 2518 bits (2792), Expect = 0.0
Identities = 1404/1408 (99%), Gaps = 1/1408 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGC 60
          |||
Sbjct 76      GGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCCTGTAGTGGGGGATAGC 135

Query 61     CCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGG 120
          |||
Sbjct 136     CCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGCGGGGACCTTCGGG 195

Query 121    CCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCA 180
          |||
Sbjct 196    CCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCA 255

Query 181    AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC 240
          |||
Sbjct 256    AGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC 315

Query 241    CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA 300
          |||
Sbjct 316    CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCA 375

Query 301    GCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAA 360
          |||
Sbjct 376    GCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGTCCGAAAGAAA 435

Query 361    TCCTTGGCTCTAATACAGCCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTA 420
          |||
Sbjct 436    TCCTTGGCTCTAATACAGTCGGGGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTA 495

Query 421    CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA 480
          |||
Sbjct 496    CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA 555

Query 481    AGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG 540
          |||
Sbjct 556    AGCGTGCGCAGGCGGTTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTG 615

Query 541    CATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACAGTGTAGCAGTG 600
          |||
Sbjct 616    CATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAATTCACAGTGTAGCAGTG 675

Query 601    AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGA 660
          |||
Sbjct 676    AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGA 735

Query 661    CGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT 720
          |||
Sbjct 736    CGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT 795

Query 721    AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAG 780
          |||
Sbjct 796    AAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACGCGTGAAG 855

Query 781    TTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC 840
          |||
Sbjct 856    TTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGC 915

Query 841    ACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGA 900
          |||
Sbjct 916    ACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGA 975

Query 901    CATGGTCGGAATCCCCTGAGAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCT 960
          |||
Sbjct 976    CATGGTCGGAATCCCCTGAGAGGTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCT 1035

Query 961    GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAAC 1020
          |||
Sbjct 1036    GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAAC 1095

Query 1021   CCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGG 1080
          |||
Sbjct 1096   CCTTGTCTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGG 1155

```

```

Query 1081 AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACA 1140
          |||
Sbjct 1156 AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACA 1215

Query 1141 ATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACC CGAGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGT 1200
          |||
Sbjct 1216 ATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAACC CGAGGGGAGCTAATCCCAGAAAACCGATCGT 1275

Query 1201 AGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT 1260
          |||
Sbjct 1276 AGTCCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGAT 1335

Query 1261 CAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA 1320
          |||
Sbjct 1336 CAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA 1395

Query 1321 GTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACC GCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATT 1380
          |||
Sbjct 1396 GTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACC GCAAGGAGGACGGTCACCACGGTAGGATT 1455

Query 1381 CATGACTGGGGTGAAGTCTAAACCAAGG 1408
          |||
Sbjct 1456 CATGACTGGGGTGAAGTCGTAA-CAAGG 1482

```

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวพัคตร์พิมล อึ้งเจริญวิวัฒน์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5011020052

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับ 2	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Pakpimol Ungcharoenwiwat and Aran H-Kittikun. 2009. Screening and optimization of wax esters synthesis by immobilized lipases. Poster presentation. The 12th National Graduate Research Conference, CGAU and Khon Kaen University, Kkon Kaen, Thailand. February 12-13, 2009.